



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DIÓXIDO DE CLORO COMO BIOCIDA**

Trabalho submetido por

**MARA JOAQUINA DE CARVALHO PRATAS**

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

**DOUTORA MARIA HELENA BARROSO**

**outubro de 2014**





*“De tudo, ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que precisamos continuar...  
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar....  
Portanto devemos:  
Fazer da interrupção um caminho novo ...  
Da queda um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro...”*  
*Fernando Pessoa*



## **Agradecimentos**

*Com este trabalho encerro mais um capítulo importante da minha formação, acima de tudo da minha vida. Quero apenas redigir algumas palavras a quem sempre me acompanhou e apoiou neste percurso.*

*Desta forma, quero prestar os meus sinceros agradecimentos à Doutora Helena Barroso, que me ajudou na orientação científica desta tese, à disponibilidade para ler, corrigir, e aconselhar.*

*Dirigindo-me à minha família, em especial, à minha mãe, e irmão, não existe nem cabe aqui tudo o que queria dizer, portanto, apenas tenho a deixar aqui o meu sincero obrigado e trazer comigo a certeza de tudo o que representam para mim. Avós, sempre foram uma inspiração, nunca deixaram de lutar e sempre me incentivaram e ajudaram bastante, fico feliz de ser o vosso orgulho. Tios e pessoal pequeno aí de casa, obrigado por me aturarem e apoiarem tanto, adorei todos os conselhos e a forma como sempre me apoiaram.*

*Amigos e em especial a ti que sempre estiveste comigo, sempre me empurraste mesmo quando eu não queria e nunca desistes-te de mim, obrigado.*

*A todos, o meu mais sincero, muito obrigado!*

*Mara Joaquina de Carvalho Pratas*

*Outubro de 2014*



## **Resumo**

As contaminações bacterianas, provêm de variadas fontes e contextos, é necessário encontrar forma de as combater. Os microrganismos podem provocar danos irreversíveis, tanto em objectos, como em alimentos, ou mesmo na saúde humana. Revelam-se um perigo para a saúde pública. Podem disseminar-se com facilidade extrema, formando estruturas complexas, ou mesmo, existindo em formas extremamente complicadas de destruir.

Para combater estes microrganismos é necessário encontrar um biocida eficaz, mas não só, também um biocida cuja aplicação não provoque danos ou alterações ao material a desinfectar, bem como não apresente características prejudiciais para a saúde humana ou animal.

Tem-se estudado o dióxido de cloro ao longo dos anos, e desde o século XIX que se iniciaram as suas aplicações. Hoje em dia, já é utilizado com segurança, na desinfecção de água, alimentos, superfícies, ou outros contextos, onde seja viável a sua aplicação. Sendo este, um biocida bastante vantajoso, sobretudo quando comparado aos que o antecederam, nas mesmas aplicações.

Neste trabalho serão revistas as suas propriedades, bem como características singulares e segurança, as suas aplicações, tentando perceber como este actua, onde e quais as funções inerentes da sua propriedade biocida. Um dos objectivos é ainda esclarecer ou clarificar, o seu mecanismo de acção sobre os microrganismos, e perceber se existe forma de este composto ser completamente eficaz na destruição bacteriana, ou se de alguma forma os microrganismos serão capazes de criar resistências a este biocida.

**Palavras-chave:** Biocida; dióxido de cloro; microrganismos; desinfecção





## **Abstract**

Bacterial contamination can be from varied sources and contexts, it's necessary to find ways to fight it. Microorganisms can cause irreversible damages in objects, aliments, or even in human health. Sometimes, they are a danger to public health spreading very easily, they can also form complex structures, or even exist in extremely hard forms to destroy.

Is necessary to combat these microorganisms by finding an effective biocide, but it's not just that, it's also necessary to find a biocide whose application doesn't cause damage or alterations to the material that we want to disinfect, as well it should not present itself harmful to humans or animal health.

Chlorine dioxide has been studied through the years, and since XIX century its applications have begun. Nowadays, it is applied safely to disinfect drinking or wastewater, food, surfaces, or in other contexts where its application are suitable. It is a advantageous biocide, particularly when compared to the preceding ones, for the same applications.

Here will be reviewed its properties, as well as its own characteristic and safety, their applications, and try to understand how it works, how and where it has its functions, from its biocidal properties point of view. One of the points will be, explain or clarify, its mechanism of action, and understand if it is really effective destroying microorganisms, or would be they able to create resistance to this biocide.

**Keywords:** Biocide; chlorine dioxide; microorganisms; disinfection



## Índice geral

Capítulo 1- Introdução geral.....	20
Capítulo 2- Produção do Dióxido de Cloro .....	24
2.1 Produção química do $\text{ClO}_2$ .....	24
2.2 Produção electroquímica do $\text{ClO}_2$ .....	25
Capítulo 3 - Segurança do dióxido de cloro .....	27
3.1 Carácter explosivo do dióxido de cloro .....	27
3.1.1 Armazenamento do dióxido de cloro .....	28
3.2 Estudos na segurança da aplicação do $\text{ClO}_2$ .....	29
3.2.1- Estudo para verificar a segurança das soluções contendo $\text{ClO}_2$ .....	29
3.2.2 Estudos para verificar a segurança do $\text{ClO}_2$ gasoso .....	31
Capítulo 4 - Dióxido de cloro aplicado a biofilmes e microrganismos .....	32
4.1 Eficácia do dióxido de cloro contra biofilmes .....	33
4.2 Eficácia do dióxido de cloro contra bactérias e esporos bacterianos .....	34
4.3 Eficácia do dióxido de cloro contra fungos .....	35
4.4 Eficácia do dióxido de cloro contra vírus .....	37
4.4.1- Fenómenos associados à desinfecção de vírus pelo Dióxido de Cloro.....	39
4.5- Eficácia do Dióxido de Cloro contra protozoários .....	40
Capítulo 5 - Dióxido de cloro aplicado na água .....	41
5.1 Dióxido de cloro utilizado no controlo de sabor e odor da água .....	43
5.2 Dióxido de cloro utilizado no controlo do ferro e manganês na água .....	44
Capítulo 6- Dióxido de Cloro aplicado a alimentos .....	45
6.1- Controlo microbiológico com dióxido de cloro nos alimentos frescos .....	48
6.1.1- Remoção de pesticidas com dióxido de cloro nos alimentos frescos .....	56
6.1.2- Controlo de escurecimento dos alimentos frescos com dióxido de cloro.....	57
6.2- Controlo microbiológico com dióxido de cloro nos alimentos minimamente processados .....	58

6.3- Controlo microbiológico com dióxido de cloro no peixe e carne .....	61
Capítulo 7- Dióxido de Cloro aplicado a superfícies .....	63
7.1- Desinfecção de equipamentos com dióxido de cloro .....	63
Capítulo 8- Mecanismos de inactivação dos microrganismos pelo Dióxido de Cloro...	70
Capítulo 9- Conclusão .....	74
Bibliografia.....	77

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Imagem esquemática das células para produção electroquímica de $\text{ClO}_2$ .....	26
<b>Figura 2.</b> Imagem de microscopia de transmissão electrónica de <i>Candida albicans</i> após $\text{ClO}_2$ .....	36
<b>Figura 3.</b> Imagem de gerador de $\text{ClO}_2$ para desinfectar pequenos espaços.....	47
<b>Figura 4.</b> Fotografia digital de maçãs desinfectadas com $\text{ClO}_2$ .....	49
<b>Figura 5.</b> Imagem esquemática do modelo de tanque de sumo de laranja desinfectado com $\text{ClO}_2$ .....	65
<b>Figura 6.</b> Fotografia tirada a gerador de $\text{ClO}_2$ gasoso para descontaminar grandes espaços.....	68



## Lista de Siglas

aq – Símbolo do estado químico aquoso

$\text{Cl}_{2(g)}$  – Símbolo molecular do cloro no estado gasoso

$\text{Cl}^-$  – Símbolo químico do ião cloreto

$\text{ClO}_2$  – Símbolo molecular do dióxido de cloro

$\text{ClO}_2^-$  – Ião clorito

$\text{ClO}_3^-$  – Símbolo químico do ião clorato

CFU/g - unidades formadoras de colónias por grama

$e^-$  – Símbolo químico de electrão desemparelhado

$E^0$  – Símbolo do potencial de oxidação/ redução

g/mol – Símbolo da unidade gramas por mol

$^{\circ}\text{C}$  – Símbolo da unidade graus Celcius

g/L – Símbolo da unidade gramas por litro

mg/L – Símbolo da unidade miligramas por litro

$\text{H}^+$  - átomo de hidrogénio

HCl – Símbolo molecular do ácido clorídrico

$\text{H}_2\text{O}$  – Símbolo molecular da água

HOCl – Símbolo molecular do ácido hipocloroso

$\text{KJ/m}^2$  - Quilojoule por metro quadrado

mmHg – Símbolo da unidade de medida milímetros de mercúrio

NaCl – Símbolo molecular do cloreto de sódio

$\text{NaClO}_2$  – Símbolo molecular do clorito de sódio

NaOH – Símbolo molecular do hidróxido de sódio



NFK - N'-formil-quinurenina

pH – Símbolo do potencial de hidrogénio

ppm – Símbolo da unidade de medida partes por milhão

psig – Símbolo da unidade de medida inglesa “*pound force per square inch*” (libra força por polegada quadrada)

V – Símbolo da unidade de medida volt



## **Objectivos e métodos**

Esta monografia foi baseada no estudo do dióxido de cloro, sobretudo atendendo e dando maior ênfase às suas propriedades como biocida.

Será efectuada uma breve exposição deste composto, abrangendo a sua referência histórica, as suas propriedades químicas, descrevendo a sua produção, bem como as suas características inerentes.

De seguida, será dado mais ênfase às suas aplicações onde se verificam as suas propriedades biocidas, como desinfectante, sanitizante, entre outras, de acordo com as suas áreas de aplicação. Os principais objectivos são descrever as suas aplicações na destruição de microrganismos, nomeadamente microrganismos existentes em biofilmes, microrganismos na água, na alimentação e por fim nas superfícies e ainda tentar perceber qual o seu nível de segurança ou risco de toxicidade potenciais para a vida humana, bem como o seu mecanismo de acção.

A escolha deste tema deveu-se ao meu interesse pela área da microbiologia, sobretudo sobre o tema dos desinfectantes, o que me levou a querer saber mais sobre esta temática. Os surtos epidémicos e a necessidade de desinfecção constantes, cada vez mais importante no dia-a-dia, as novas formas de resistência dos microrganismos, bem como a dificuldade em os controlar, também me motivaram neste sentido.

A investigação desta monografia foi iniciada com a pesquisa, selecção e recolha de informação em artigos científicos, livros que se referiam ao tema proposto e *sites* internacionais de entidades reguladoras desta temática no período decorrido entre Fevereiro e Outubro de 2014.

A actualidade dos artigos científicos foi valorizada ao longo de toda a pesquisa dando-se preferência aos mais recentes e relevantes. Os artigos seleccionados para a elaboração desta dissertação encontram-se inseridos no período compreendido entre 1999 e 2014.

Para a realização da bibliografia foi utilizado o programa de organização e gestão de citações e referências bibliográficas, *Mendeley Desktop*<sup>®</sup>, versão 1.12.1.

## **Capítulo 1- Introdução geral**

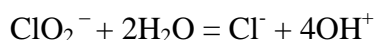
Em 1811, Sir Humphery Davys, químico britânico, foi o primeiro a descobrir o dióxido de cloro, ao oxidar potássio perclorado, vindo a chamar-lhe o gás verde-amarelo “*euchlorine*” (Miura & Shibata, 2010; H.-S. Shin & Jung, 2006).

Pode-se dizer que o dióxido de cloro é um gás verdadeiro à temperatura ambiente, pois não sofre qualquer alteração com as variações de temperatura ou atmosféricas.

O dióxido de cloro, na sua forma gasosa, possui os seus electrões desemparelhados (radicais livres), o que o potencia como agente oxidante. Destaca-se o seu cheiro clorado, a sua coloração, que está entre o amarelo e o verde, e a relativa facilidade com que se dissolve em água, cerca de 20g de ClO<sub>2</sub> conseguem ser dissolvidos em um litro desta, a temperaturas de 0 a 5°C e pressões de 70 a 100 mmHg. É possível fazer a monitorização do composto com um espectrofotómetro de radiação ultravioleta, sendo assim viável monitorizar a sua descontaminação desde o seu início ao seu fim.

Este composto tem como fórmula química “ClO<sub>2</sub>”, sendo constituído por um átomo de cloro e dois de oxigénio. Tem uma massa molecular de 67,45g/mol, ponto de fusão a -59°C e ponto de ebulição a +11°C, sendo que estes dados variam um pouco, de acordo com as fontes. Não é cancerígeno e produz uma baixa quantidade de resíduos quando comparado com outros desinfectantes (M. Czarneski, 2007; Rastogi et al., 2010).

Podemos aferir o seu poder como desinfectante em relação a outros desinfectantes recorrendo ao seu potencial de oxidação/redução ou, dito de uma forma mais simples, ao seu potencial redox. O seu potencial redox (E<sup>0</sup>) é relativamente alto, de 0,95V. O ClO<sub>2</sub>, na presença de água, captura quatro electrões e é reduzido ao ião cloreto (Cl<sup>-</sup>), cujo potencial redox equivale a 0,78V. Este valor é menor do que do ClO<sub>2</sub>, mas é mais forte do que o clorito (ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>):

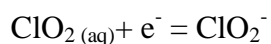


O E<sup>0</sup> do ClO<sub>2</sub> é menor do que o do radical hidroxilo (E<sup>0</sup>=2,8V), do ozono (E<sup>0</sup>=2,07V) e do ácido hipocloroso (E<sup>0</sup>=1,49V), portanto, o ClO<sub>2</sub> revela poder para

desencadear reacções mais selectivas e oxidativas do que as outras moléculas (Miura & Shibata, 2010).

O  $\text{ClO}_2$  é um composto neutro de cloro no estado oxidado. Desinfecta por oxidação, não por clorificação. É relativamente pequeno, volátil, possui forma de radical livre até mesmo diluído em solução aquosa e a sua molécula é altamente energética.

Em elevadas concentrações, este reage violentamente com agentes redutores, contudo, é estável quando diluído em água e em contentor fechado, com ausência de luz. Quando diluído, o  $\text{ClO}_2$  funciona como um oxidante altamente selectivo devido ao seu mecanismo de transferência de um único electrão, passando este a ficar reduzido a  $\text{ClO}_2^-$ :



Uma das características mais importantes deste composto é a sua elevada solubilidade em água, sobretudo quando arrefecida. Sendo que este contrasta com a hidrólise do gás de cloro em água (o  $\text{ClO}_2$  não hidrolisa, mas permanece em solução como um gás dissolvido).

Este é, aproximadamente, 10 vezes mais solúvel do que o cloro (a uma temperatura superior a  $11^\circ\text{C}$ ), no entanto, é extremamente volátil e pode ser removido com facilidade de soluções aquosas com aerização ou recarbonização com dióxido de carbono (a temperatura superior a  $11^\circ\text{C}$  ou  $12^\circ\text{C}$ ). Enquanto radical livre no estado gasoso, reage de forma mais lenta com a água.

O  $\text{ClO}_2$  não pode ser armazenado ou comprimido porque, na forma de gás sob pressão tem um comportamento explosivo, e soluções aquosas muito concentradas deste composto podem libertar, para a atmosfera, concentrações de  $\text{ClO}_2$  superiores às permitidas.

Pode-se dizer, de forma genérica, que o pH não afecta significativamente poder de desinfectação deste composto. No entanto, a temperatura pode diminuir bastante a eficácia deste processo. É mais eficaz que outros desinfectantes como o cloro, ou o hipoclorito de sódio, ou mesmo o ozono. É eficaz contra vírus, bactérias, protozoários,

(*Giardia* e *Cryptosporidium*), algas, e até plâncton. (“EPA Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants,” 1999).

O  $\text{ClO}_2$  é um desinfectante popular, usado desde finais do século XIX, contudo, as suas aplicações têm sido dificultadas, pois é bastante complicado preparar um sal estável que esteja livre de contaminações.

Desde 1920 este gás é conhecido pelas suas propriedades desinfectantes. Foi reconhecido como agente quimioesterilizante em 1984, sendo posteriormente registado em 1988, nos Estados Unidos, para utilização como esterilizante.

Hoje em dia, é usado em tratamentos de água, processamento de alimentos, cuidados veterinários e dentários, desinfecção de superfícies, entre outras.

O seu efeito desinfectante é superior ao do cloro, como já referido, e tem como vantagem não formar compostos halogenados quando em contacto com matéria orgânica, por isso, não é considerado cancerígeno.

O  $\text{ClO}_2$  oxida-se a cloreto, mas não forma produtos tóxicos. Não é tóxico para humanos até 3000ppm e não é alergénico. É volátil, o que assegura rápida evaporação sem resíduos.

Além disso, esta molécula é única, pois dissolve-se tanto em soluções aquosas, como oleosas ou ainda em solventes polares orgânicos. O  $\text{ClO}_2$  não é só um desinfectante orgânico de superfícies, têm também, a capacidade de penetrar a pele, ou mesmo membranas, alcançando pequenos milímetros de profundidade.

O decaimento deste, quando em solução, é um processo lento, 10 a 15% de perda após, aproximadamente, dois anos à temperatura ambiente. Com elevado grau de pureza é completamente seguro aplicar uma solução com este conteúdo a humanos, devido à sua capacidade de dissolução elevada, torna-se um antiséptico local extremamente eficaz.

Várias pesquisas serão aqui expostas, visando mostrar a efectividade do dióxido de cloro como agente biocida, com propriedades desinfectantes, quer na forma gasosa ou líquida.

O dióxido de cloro é eficaz contra bactérias, esporos, vírus e algas, contudo, a escolha entre a sua forma líquida ou gasosa irá depender sempre de onde se pretende aplicar este biocida, pois o local irá influenciar a sua acção e por vezes uma forma é mais adequada que outra.

É de salientar que o dióxido de cloro tem vindo a ser estudado e a apresentar bons resultados, quer na redução de microrganismos patogénicos que infectam alimentos como fruta ou vegetais, quer na desinfeção de superfícies que contactam com os alimentos.

O dióxido de cloro gasoso é bastante utilizado para descontaminar salas e vastas áreas contaminadas devido ao seu sucesso na descontaminação de vários edifícios, tendo sido testada a sua eficácia em diversos materiais (Rastogi et al., 2010).

Este é ainda bastante utilizado nos tratamentos e descontaminação de água para consumo humano ou outros fins.

## Capítulo 2- Produção do Dióxido de Cloro

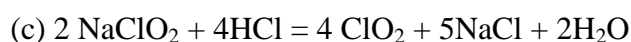
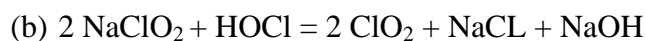
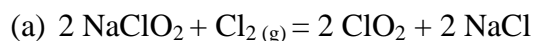
Para produzir  $\text{ClO}_2$  há que ter em conta diferentes variáveis, sobretudo para que fim se irá destinar. Este é produzido na sua forma gasosa, podendo depois ser diluído em água e daí se obter este gás na forma líquida. Pode ser aplicado como biocida nestas duas formas.

Ainda existem algumas desvantagens e complicações para a produção de grandes quantidades de  $\text{ClO}_2$ , portanto há que perceber se é viável produzir e armazenar este gás ou se este deve ser produzido no seu local de aplicação, para evitar complicações.

Quando queremos produzir este gás, atendemos às suas propriedades químicas, fazendo reagir os componentes necessários. Hoje em dia, pode e estuda-se a possibilidade de o produzir de forma electroquímica, apresentando-se vantajoso em alguns aspectos.

### 2.1 Produção química do $\text{ClO}_2$

Quando se quer produzir dióxido de cloro, faz-se reagir o cloreto de sódio, com cloro gasoso, ácido hipocloroso ou ácido clorídrico. Portanto, genericamente o  $\text{ClO}_2$  é sintetizado de acordo com as seguintes reacções:



Destas reacções podemos chegar à forma como os químicos interagem estequiometricamente para formar o  $\text{ClO}_2$ , e percebe-se porque é que nalgumas destas reacções se deve ter mais preocupação com as características do meio em que ocorre a reacção ou não. Mais especificamente, deve-se controlar o pH ou os produtos que as mesmas podem originar.

A primeira equação mencionada (a) é uma reacção rápida e deve ocorrer a pH neutro, enquanto que, a ultima reacção (c) é uma reacção mais lenta, devendo-se ter cuidado com a produção do ião clorato ( $\text{ClO}_3^-$ ), e deve esta ser realizada a baixo pH. Assim, quando se utiliza o pH baixo nesta última reacção, se ele for demasiado baixo (pH inferior a 3), há o risco de se produzir mais ião clorato do que dióxido de cloro.



No caso de haver aumento da quantidade de gás  $\text{ClO}_2$  na atmosfera, aumentando a concentração de cloro livre a baixo pH na solução aquosa, pode formar-se íão clorato. Isto também poderá ocorrer quando o clorito diluído está a baixo pH, ou misturando soluções que sejam muito ácidas, ou ainda pelo excesso de ácido hipocloroso que directamente oxida os íões de clorito a clorato.

Em geral, os geradores de  $\text{ClO}_2$  são relativamente simples, utilizando-se apenas câmaras simples de mistura. Estas são preenchidas, normalmente, com teflon para gerar turbulência hidráulica aquando da mistura, e devem ter uma válvula na descarga para permitir monitorizar o processo. (“EPA Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants,” 1999)

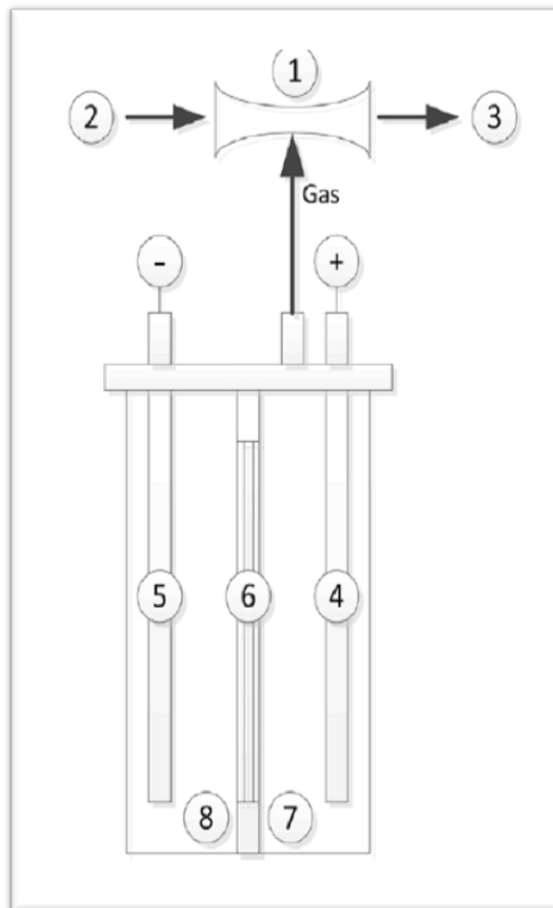
## 2.2 Produção electroquímica do $\text{ClO}_2$

Tendo em conta os riscos e as características do armazenamento e transporte do  $\text{ClO}_2$ , a produção de aplicação local é a forma de eleição para a sua produção. Comparativamente à forma de produção química, a produção electroquímica do  $\text{ClO}_2$  dispõe de algumas vantagens, tais como: a produção mais fácil de uma simples dose, e uma produção contínua, com uma elevada taxa de pureza, para aplicação local.

As câmaras utilizadas para a produção deste biocida podem ser como a descrita na figura 1. Esta câmara é revestida exteriormente por polipropileno de alta resistência, dividida ao meio por uma membrana de troca iónica que separa as duas câmaras do ânodo e do cátodo, bem como das células electrolíticas de ambos os lados. Cada uma destas células, com a capacidade de um litro, poderá conter cloreto de sódio na célula do ânodo, e hidróxido de sódio na célula do cátodo. Em torno dos eléctrodos há a produção de cloro e hidrogénio moleculares. A mistura destes dois gases gera uma reacção termogénica, esta mistura deverá ser correctamente manuseada, caso contrário pode correr-se risco de explosão.

A electrólise foi desenvolvida usando um eléctrodo de titânio no ânodo, sendo este composto de irídio e ruténio. Durante a electrólise o gás de  $\text{ClO}_2$ , formado na parte do ânodo, é arrastado para fora deste lado da câmara, pelo injector de Venturi, sendo este gás posteriormente dissolvido em água no interior do injector e daí resultando a solução de  $\text{ClO}_2$ . Tsai e colaboradores (2014), referem que conseguiram produzir o composto a uma concentração de 906,5mg/L com uma pureza de 98,4%, numa reacção

de apenas 20 minutos, a 12 volts, temperatura inicial de 30°C no ânodo, e pH 7 (Tsai, Chang, Chang, Hsieh, & Shen, 2014) .



**Figura 1.** Imagem esquemática das células eletrolíticas utilizadas no estudo. (1) injetor de Venturi; (2) entrada de água; (3) saída de  $\text{ClO}_2$  gasoso; (4) ânodo; (5) cátodo; (6) membrana de troca iônica; (7) meia célula de eletrólitos do ânodo; (8) meia célula de eletrólitos do cátodo. (Adaptado de: Tsai, Chang, Chang, Hsieh, & Shen, 2014)

## **Capítulo 3 - Segurança do dióxido de cloro**

O  $\text{ClO}_2$  obedece a características rigorosas de armazenamento, não podendo este ocorrer sem as condições necessárias para tal. Deve atender-se as suas propriedades químicas, bem como aos seus níveis limite, permitidos. Deve ser feito de acordo com determinadas normas, e para quantidades determinadas especificamente. É um processo rigoroso, que necessita de controlos constantes, deve ser monitorizado frequentemente.

Será importante, também, verificar de facto, se este biocida apresenta, ou não, riscos para a saúde humana, ou para qualquer outro organismo vivo, atendendo a estudos realizados neste contexto. Deve ser-se criterioso, quando se coloca algum químico em contacto tão directo com seres vivos. Este deve apresentar provas de que não representa qualquer risco para a saúde dos mesmos, conseguindo determinar quais os níveis a que nos podemos expor, e acima dos quais não poderemos contactar.

### **3.1 Carácter explosivo do dióxido de cloro**

O  $\text{ClO}_2$  é um forte oxidante é um óptimo desinfectante, não só do ponto de vista ambiental, mas também devido ao seu vasto campo de aplicação. Normalmente, quando misturado com o ar apresenta coloração amarela a esverdeada característica, como referido anteriormente. No seu estado puro o este composto é instável e pode decompor-se em cloro e oxigénio quando exposto a radiação. Assim sendo, é importante manter este gás fora de contacto com a radiação solar ou radiação ultra violeta.

É de salientar a diferença deste gás quando se encontra dissolvido em água, neste caso apresenta uma estabilidade exactamente oposta. As soluções de  $\text{ClO}_2$  são estáveis e fáceis de manusear. O  $\text{ClO}_2$  gasoso, no entanto, não pode ser comprimido ou armazenado comercialmente porque este decompõe-se com o tempo e é altamente explosivo a concentrações superiores, considerando-se como superior quando este apresenta uma concentração superior a 10% pelo volume de ar na área em estudo. Sendo assim, a melhor forma de utilizar  $\text{ClO}_2$  gasoso será gera-lo no local de aplicação, sendo que podemos encontrar a sua dose permitida definida pela *Occupational Safety and Health Administration* de 0,1ppm.

De acordo com R. Jin e colaboradores (2008, 2009), numa concentração de 9,5% de  $\text{ClO}_2$  pelo volume de ar, este apresenta caracter explosivo, mas abaixo deste valor, portanto a uma menor concentração, o  $\text{ClO}_2$  não apresenta qualquer risco de explosão.

Este gás apresentará um risco de explosão na proporcionalidade inversa do seu tempo de exposição, em relação à sua concentração, ou seja, terá um aumento do seu carácter explosivo, em tão menor período de tempo, quanto maior a sua concentração (R. Jin, Hu, Zhang, & Bo, 2009; R. Y. Jin, Hu, Zhang, & Bo, 2008).

### **3.1.1 Armazenamento do dióxido de cloro**

Deve atender-se a determinadas características quando se pretende armazenar  $\text{ClO}_2$ , para que a sua estabilidade se mantenha durante todo o processo e tempo de armazenagem.

Em geral, os sistemas de armazenamento do  $\text{ClO}_2$  devem ter uma zona de armazenamento e enchimento com espaço adequado, isto é, não se devem usar nesses espaços materiais combustíveis, nem mesmo para a construção dos próprios locais.

O armazenamento do  $\text{ClO}_2$  deve ser feito em contentores limpos, fechados e não translúcidos, pois a exposição à luz solar, raios ultravioleta ou calor excessivo vão degradar este composto.

Deve-se evitar o armazenamento ou manuseamento de materiais combustíveis ou reactivos, tais como ácidos ou compostos orgânicos nas mesmas áreas que se trabalha com o clorito de sódio.

Devem existir contentores secundários para armazenagem, áreas de manuseamento secundárias para melhor controlo de derrames com colectores de forma a facilitar a recuperação dos reagentes e uma fonte de água para as limpezas que forem necessárias, perto da área de trabalho e armazenamento.

O material utilizado deve ser inerte para contacto directo com oxidantes fortes e/ou soluções ácidas que estejam em contacto directo com o  $\text{ClO}_2$ . É aconselhável no exterior das áreas químicas a existência de mascaras de gás e *kit* de primeiros socorros.

Os reactores devem ter partes em vidro ou devem ser feitos com algum revestimento translucido para se poder, com mais facilidade, controlar todo o sistema. Deve-se monitorizar os fluxos em todas as linhas químicas, áreas de diluição e linhas de produção de  $\text{ClO}_2$ . Deve haver especial cuidado com a linha de diluição de água, de modo a evitar depósitos de cálcio e devendo esta ser feita a pH aproximadamente neutro. Deve haver controlo e devem ser feitos testes frequentes às forças das soluções

químicas utilizadas, isto para se alcançar um controlo eficiente de todo o processo. Os tanques de armazenagem devem ter respiradouros para o exterior. A ventilação deve ser adequada e deve monitorizar-se a qualidade do ar.

O contacto do ar com o  $\text{ClO}_2$  deve ser controlado, para evitar a possibilidade de uma concentração explosiva. Deve, portanto, existir um controle perto da zona de produção e armazenagem. Se a concentração de  $\text{ClO}_2$  no ar estiver entre 8 e 10 % por volume de ar, esta deve ser evitada pois existe risco de explosão. É possível aplicar dois processos para evitar que isto aconteça que será o seu armazenamento sob vácuo, ou sob pressão positiva elevada (entre 45-75 psig) isto para prevenir o depositar de  $\text{ClO}_2$  gasoso na parte superior do tanque de armazenagem e ainda para que o  $\text{ClO}_2$  possa ser ventilado para a atmosfera, evitando elevadas concentrações locais, prevenindo o risco durante toda a sua armazenagem.

Quando o  $\text{ClO}_2$  está presente a uma concentração inferior a 10g/L este não irá evaporar em quantidade suficiente para apresentar um risco de explosão à maioria das condições atmosféricas de pressão e temperatura.

Para os tratamentos de água as concentrações de  $\text{ClO}_2$  dissolvido raramente excedem os 4g/L, a temperaturas menores que 40°C, e os níveis de  $\text{ClO}_2$  para tratamento, geralmente, limitam-se entre 0,1 a 5,0 mg/L. Logo, para melhor a segurança, em caso das temperaturas excederem os 50°C, os tanques devem ter uma ventilação adequada, controlando assim a evaporação de  $\text{ClO}_2$  (“EPA Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants,” 1999).

### **3.2 Estudos na segurança da aplicação do $\text{ClO}_2$**

De acordo com as características do  $\text{ClO}_2$  e possíveis aplicações, a sua aplicação na desinfecção de produtos de consumo humano, é essencial verificar quais os efeitos deste biocida na saúde humana. Sendo que, nem sempre é possível testar em humanos determinadas condições, deve tentar perceber-se, através de alguns estudos, a viabilidade, ou não, da sua aplicação a humanos, directa ou indirectamente.

#### **3.2.1- Estudo para verificar a segurança das soluções contendo $\text{ClO}_2$**

Quando se evita estudos em humanos, pode pensar-se, na experimentação animal. Estudos em ratos é sempre a opção mais fácil e viável. Para estudar a solução de  $\text{ClO}_2$  administrou-se este em solução, durante 90 dias, a 25ppm (2mg/Kg por dia) e

foram observados poucos efeitos adversos nos ratos estudados. Num outro estudo, utilizou-se  $\text{ClO}_2$  solução oral por 2 anos a 10ppm (1,3mg/Kg por dia) e não foram observados efeitos adversos.

Também se realizou um ensaio em macacos africanos em que se adicionou solução de  $\text{ClO}_2$ , administrada oralmente por 6 semanas a 30ppm (3,5mg/Kg por dia) e não foram observados efeitos adversos, mas a 100ppm (9,5mg/Kg por dia), já se observaram alguns efeitos adversos, embora poucos.

Investigou-se o metabolismo do  $\text{ClO}_2$  administrado oralmente a ratos, utilizando a molécula radioactiva ( $^{36}\text{ClO}_2$ ), revelando que no plasma o  $^{36}\text{Cl}$  atingiu um pico de concentração em 2 horas após a sua administração e que 30% da radioactividade é excretada na urina após 72 horas à sua administração. Aproximadamente 80% do  $^{36}\text{Cl}$  ficou na forma de  $\text{Cl}^-$ , a maioria do que se manteve radioactivo foi o  $\text{ClO}_2^-$ , e uma pequena quantidade de  $\text{ClO}_3^-$ .

Estudou-se também a toxicidade do  $\text{ClO}_2$  em solução aplicada a animais em doses mais elevada, ou seja, acima de 5000mg/Kg, e a toxicidade de inalação superior a 12,000mg/m<sup>3</sup>. Não foram observadas irritações dérmicas e as irritações da mucosa foram mínimas (Miura & Shibata, 2010).

Para caracterizar o efeito deste biocida em humanos, testou-se, o consumo de água contendo 5ppm  $\text{ClO}_2$ , durante 12 semanas, e não houve sinais de efeitos tóxicos. Foi, também, estudada a toxicidade a curto prazo em humanos em mais dois estudos. Num primeiro estudo, um grupo de 10 homens saudáveis adultos beberam 1000 mL de água (dividida em duas porções de 500 ml, separadas por 4 horas de intervalo) com concentrações que variavam entre os 0 ou 24 mg/L de concentração de  $\text{ClO}_2$  (fazendo assim 0,34 mg / kg, assumindo como referência um peso corporal de 70 kg). Num segundo estudo, em um grupo de 10 homens adultos, foi distribuída água com 500 ml que continha 0 ou 5 mg/L de  $\text{ClO}_2$  (resultando em 0,04 mg/kg por dia, assumindo na mesma um peso corporal de referência 70 kg), durante 12 semanas. Realizaram-se testes aos sinais vitais, dos indivíduos estudados, à pressão arterial, à frequência respiratória, e temperatura corporal, sendo que também se analisaram os parâmetros séricos, detalhadamente a glicose, a ureia, o fósforo, a fosfatase alcalina, entre outras, e verificando-se ainda as hormonas tiroideias, e os parâmetros hematológicos. Sendo que, em nenhum estudo se verificou qualquer alteração fisiológica relevante no estado geral

dos indivíduos (Miura & Shibata, 2010; U.S. Environmental Protection Agency, (EPA), 2000).

Concluindo, para soluções que contêm  $\text{ClO}_2$ , pode dizer-se que, mesmo em elevadas concentrações, estas demonstram ser seguras, inclusive para aplicação doméstica.

### **3.2.2 Estudos para verificar a segurança do $\text{ClO}_2$ gasoso**

Realizaram-se também estudos com ratos para testar a segurança do  $\text{ClO}_2$  gasoso, e após exposição a 260ppm com  $\text{ClO}_2$  gasoso por duas horas, alguns ratos morreram, mas expostos a 0,01ppm (média do nível de gás administrado durante 10 semanas a 0,05 a 0,3ppm) por 5 horas, 7 dias por semana, durante 10 dias não ocorrerem quaisquer sinais de toxicidade ou morte.

A libertação do gás de  $\text{ClO}_2$  a 0,1ppm cai dentro do intervalo permitido pela *Occupation Safety and Health Administration*, em média para 8 horas por dia, e nas 10 horas de média permitidos pela *National Institute of Occupational Safety* e ainda com o nível padrão para 8h por dia durante 40horas semanais, permitido pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienis*, entidades americanas reguladoras desta temática.

Pode então concluir-se que, não é necessário dar muito enfase à preocupação com a toxicidade provocada se se utilizar doses baixas de  $\text{ClO}_2$  gasoso, respectivamente quando as referências são, exposições inferiores a 0,01ppm (Miura & Shibata, 2010).

Portanto, o  $\text{ClO}_2$  gasoso pode ser utilizado a baixa concentração em espaços como escritórios, teatros, hotéis, escolas, ou mesmo aeroportos, sem necessidade de evacuar ou interromper as actividades quotidianas individuais (Ogata & Shibata, 2008).

## **Capítulo 4 - Dióxido de cloro aplicado a biofilmes e microrganismos**

Uma das principais aplicações deste composto é na destruição de microrganismos, sendo que o seu maior desafio são os biofilmes. Os biofilmes entendem-se por uma estrutura de bactérias altamente organizada, onde estas se encontram “encapsuladas” numa matriz polimérica produzida pelas mesmas.

Devido à sua estrutura a penetração dos desinfetantes num biofilme é limitada, comprometendo a sua efectividade em camadas mais profundas desta estrutura mais complexa.

Do ponto de vista médico os biofilmes são muito importantes, pois representam mais de 80% das infecções em humanos.

Sendo, portanto, uma grande vantagem apresentada pelo  $\text{ClO}_2$ , este é efectivo contra estas estruturas, pois mostra efectividade até a concentrações relativamente baixas (Herczegh et al., 2013).

O  $\text{ClO}_2$  é selectivo porque o tempo para matar microrganismos é proporcional ao quadrado do tamanho dos mesmos, então pequenos microrganismos são mortos extremamente rápido (na ordem dos milésimos de segundo por exemplo quando nos referimos a bactérias). Visto que, o dióxido de cloro é volátil, o seu tempo de contacto é limitado a poucos minutos, o que faz dele um biocida bastante eficaz.

O dióxido de cloro tem uma janela terapêutica grande a surpreendentemente baixas concentrações e pouco tempo de contacto é capaz de matar bactérias, mas com o aumento da concentração e tempo de contacto a sua utilização a ser segura.

Contudo, elevadas concentrações de dióxido de cloro gasoso, por longos períodos de tempo, pode ser perigoso para humanos, porque a membrana alveolar é muito fina, sendo este composto capaz de a atravessar, ainda assim o efeito do dióxido de cloro nessa membrana é contrabalançado pelo intensa circulação sanguínea nessa área.

O  $\text{ClO}_2$  é, portanto, um bom biocida, pois actua localmente evitando assim envenenamento sistémico e ainda tem a vantagem de não atrasar o processo de cicatrização, não sendo, por isso citotóxico.



É um biocida bastante efectivo, dado que, os microrganismos não desenvolvem resistências contra ele. O  $\text{ClO}_2$  é um agente oxidante fortemente selectivo, não reage ou reage lentamente com a maioria dos compostos orgânicos dos tecidos vivos.

Este composto provoca alterações irreversíveis, na estrutura das proteínas das bactérias ou tecidos infectados. As células de mamíferos, contudo, sobrevivem pois a circulação sanguínea transporta componentes redutores para a célula constantemente, reparando e revitalizando os mesmos, e além disso o tamanho entre estes é diferente, varia de uma única célula para organismos multicelulares mais complexos. A circulação sanguínea é, portanto, uma protecção para os organismos multicelulares, ajudando-os a sobreviver, enquanto que, esse tipo de apoio não existe para as bactérias.

O  $\text{ClO}_2$  tem actividade antibacteriana, antifúngica, antiviral numa ordem de, aproximadamente, dez vezes superior ao hipoclorito de sódio. Este composto inactiva quase todo o tipo de microrganismos incluindo algas, plâncton e protozoários.

Este pode remover biofilmes porque é altamente solúvel em água e não reage com os polissacáridos extracelulares do biofilme. Desta forma, este pode penetrar rapidamente no biofilme e atingir microrganismos no interior do mesmo.

O  $\text{ClO}_2$  é um agente antimicrobiano, selectivo que pode matar microrganismos muito pequenos rapidamente, mas não provoca dano a organismos de maior porte como animais e humanos, dado que ele não consegue penetrar profundamente nos tecidos vivos. Além disso, como já referido, a circulação sanguínea fornece uma barreira adicional contra o  $\text{ClO}_2$  nos organismos multicelulares.

É, portanto, chamado de biocida ideal pois destrói microrganismos rapidamente sem causar danos nos humanos ou animais (Noszticzius et al., 2013).

#### **4.1 Eficácia do dióxido de cloro contra biofilmes**

A *Listeria monocytogenes* tem uma elevada taxa de mortalidade entre os organismos patogénicos provenientes de alimentos. É resistente ao congelamento e a vários tipos de processamento. Pode ser, inclusive, responsável por provocar meningite. O tratamento de um biofilme deste microrganismo com  $\text{ClO}_2$  mostra que, em curto espaço de tempo, o  $\text{ClO}_2$  aquoso origina uma elevada redução das células do mesmo.

Quando se utiliza o  $\text{ClO}_2$  no estado gasoso, a redução das células do biofilme é mais lenta, deve ser pela lenta difusão do  $\text{ClO}_2$  gasoso e posterior dissolução na água presente na superfície do biofilme. Esta diferença passa a ser menor, ou até mesmo sem significado, quando se prolonga o tempo de tratamento. Uma vez o gás dissolvido na água, as suas efectividades são similares. O  $\text{ClO}_2$  no estado gasoso necessita apenas de mais tempo para apresentar actividade bactericida comparável, sendo que a presença de humidade pode beneficiar a efectividade do gás para períodos de tempo inferiores.

Vaid, Linton, & Morgan (2010), verificaram que quanto mais longo o tratamento de *Listeria monocytogenes*, mais aproximados seriam os efeitos do  $\text{ClO}_2$  gasoso e aquoso, ajudando a suportar a teoria de que em ambos os estados, e mesmo a baixas concentrações, este é um biocida eficaz. Quando realizaram este trabalho os biofilmes foram directamente expostos aos agentes desinfectantes para representar o pior cenário, ou seja representam o efeito do biocida directamente no biofilme (Vaid, Linton, & Morgan, 2010).

Foi estudado por Herczegh e colaboradores (2013), a eficácia deste composto na destruição de biofilmes de *Enterococcus faecalis*, mostrando boa taxa de sucesso, sendo mais eficaz e efectivo do que os desinfectantes utilizados mais frequentemente (hipoclorito de sódio e clorhexidina) e ainda sendo mais eficaz contra a reinfecção deste microrganismos. Devido ao seu carácter não toxico e volátil, este apresentou a vantagem de não ser necessária a neutralização dos seus resíduos, em contraste com outros produtos. Por apresentar carácter volátil, também apresentou a vantagem de ter mais facilidade a atingir locais de difícil acesso (Herczegh et al., 2013).

#### **4.2 Eficácia do dióxido de cloro contra bactérias e esporos bacterianos**

M. A. Czarneski & Lorcheim (2005), referiram que o  $\text{ClO}_2$  aquoso é eficaz contra *Bacillus anthracis* e *Bacillus subtilis*, sendo capaz de inactivar estas bactérias patogénicas (M. A. Czarneski & Lorcheim, 2005).

É eficaz na destruição de esporos de *Bacillus*, estruturas de resistência máxima das bactérias. Como relatado por Kim e colaboradores (2008), na destruição de esporos da espécie *Bacillus cereus*, observou-se uma significativa redução após o uso de  $\text{ClO}_2$  (H. Kim, Kang, Beuchat, & Ryu, 2008).

Wang e colaboradores (2010), testaram a eficácia do  $\text{ClO}_2$  para destruir a bactéria *Vibrio parahaemolyticus* presente nas ostras. Obtiveram bons resultados na sua inactivação. Atingiram um resultado de 91,1% de inactivação desta bactéria, assumindo que poderiam atingir 96,26%. No entanto, mesmo sendo sempre eficaz contra os microrganismos, a desinfecção com  $\text{ClO}_2$  pode ser afectada pelo meio em que se processa a mesma. A temperatura da água ou o aumento da quantidade de proteínas presentes pode afectar a desinfecção.

Após a utilização do  $\text{ClO}_2$  aquoso nas ostras, a diferentes temperaturas, verifica-se algum efeito residual nos seus tecidos. Assim, os autores concluíram que este composto pode utilizar-se para aumentar a vida das ostras e melhorar a segurança microbiológica das mesmas.

Este estudo mostrou que o  $\text{ClO}_2$  é bastante efectivo a diminuir os organismos patogénicos que afectam os mariscos (Wang *et al.*, 2010).

Smigic e colaboradores (2010), realizaram um estudo para verificar a acção do  $\text{ClO}_2$  na bactéria *Campylobacter jejuni* e verificaram que o composto originou uma diminuição de, aproximadamente, 97% da população de *Campylobacter jejuni*, um resultado bastante satisfatório que também vem confirmar as referências de que este é um biocida bastante eficaz (Smigic *et al.*, 2010).

#### **4.3 Eficácia do dióxido de cloro contra fungos**

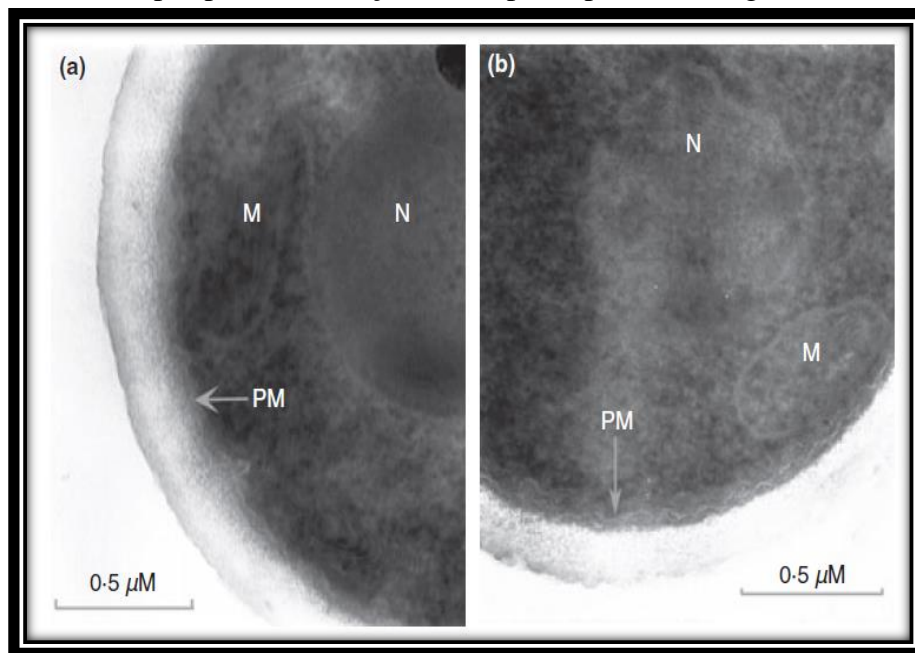
Wei e colaboradores (2008), estudaram a eficácia do  $\text{ClO}_2$  na membrana de *Candida albicans*, a levedura potencialmente patogénica mais frequentemente isolada em humanos.

No microscópio electrónico visualizaram a parede celular da *Candida albicans*, composta de uma densa camada exterior, com outras interiores menos densas e separadas por espaços. A camada mais externa da membrana vê-se muito perto a pressionar a membrana plasmática, que tem um perfil irregular devido à presença de muitas invaginações para o interior da célula.

Os organelos, incluindo núcleo e mitocôndria, também foram claramente vistos. Contudo apesar de 99,12%  $\pm 0,21$  das células serem inactivadas com tratamentos de 15 mmol/L de  $\text{ClO}_2$ , elas mantiveram a sua forma e integridade. As estruturas continuam

visíveis, mas o citoplasma ficou com aparência rugosa quando comparado com as amostras do controle.

A parede celular parecia igual, mas menos densa e sem danos visíveis na membrana plasmática, como buracos, reentrâncias ou plasmólise (como é visível na figura 2). Concluíram que, o  $\text{ClO}_2$  danifica a membrana plasmática da célula maioritariamente por permeabilização, e não por ruptura da integridade da membrana.



**Figura 2.** Imagem de microscopia de transmissão electrónica da *Candida albicans*. (a) Imagem do controlo não exposto a dióxido de cloro, mas na presença de outros químicos; (b) *Candida albicans* tratada com dióxido de cloro a 15mmol/L durante 10 minutos. Ampliação: 50 000 vezes. M= mitocôndria N= núcleo PM= membrana plasmática. (Adaptado de: Wei, Wu, Huang, Wu, & Zhang, 2008)

Eles justificam que, a libertação de potássio que se verificou nesta levedura, após exposição ao biocida, se deveu ao facto da afinidade do  $\text{ClO}_2$  para os aminoácidos controladores dos canais deste ião provocando a falha no controle de libertação do mesmo.

O  $\text{ClO}_2$  é um oxidante inespecífico, actua nos componentes intracelulares, como se vê na figura 2. Promovendo um resultado inconclusivo do seu efeito. Contudo, estes revelam que a permeabilidade do potássio e a despolarização são sem dúvida críticos para todo o processo de inviabilidade do microrganismo.

Resultou que o  $\text{ClO}_2$  matou aproximadamente 99,9% deste fungo, ocorrendo danos na membrana celular devido à, já referida, permeabilização do potássio e a perda da integridade da membrana foi mínima (Wei, *et al.* 2008).

Wilson e colaboradores (2005), que estudaram o efeito do gás de  $\text{ClO}_2$  para inactivar e matar fungos como *Stachybotrys chartarum*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum*. O  $\text{ClO}_2$  mais uma vez atuou como um poderoso oxidante, que afecta a integridade celular da membrana dos microrganismos, impedindo a germinação dos fungos. Sendo que 500ppm é suficiente para impedir o crescimento dos mesmos. No entanto, os ascósporos de *Chaetomium globosum* não foram inactivados com o  $\text{ClO}_2$  e fizeram uma espécie de barreira contra o gás.

O fungo *Stachybotrys chartarum*, continuou tóxico mesmo após inactivação, pois devido aos seus conídeos não foi possível a inactivação por completo.

O  $\text{ClO}_2$ , apresentou-se deste modo, completamente eficaz contra *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium chrysogenum* (Wilson *et al.*, 2005).

No entanto, neste estudo, é de salientar que apenas foi utilizada a técnica de desinfecção mediante o uso de  $\text{ClO}_2$  gasoso, não há como concluir no caso de ser utilizado  $\text{ClO}_2$  aquoso, mas provavelmente se chegasse com mais facilidade às estruturas mais isoladas ou de difícil acesso de forma mais eficaz, talvez se conseguisse assim uma melhor desinfecção e inactivação de todas as espécies.

#### 4.4 Eficácia do dióxido de cloro contra vírus

Sanekata e colaboradores (2010), descreveram a eficácia de  $\text{ClO}_2$  contra alguns vírus, sendo eles o Calicivírus felino, o vírus Influenza humano, o vírus do sarampo, o vírus da cinomose canina, o vírus do Herpes humano, o Adenovirus humano e canino e o Parvovirus canino, mostrando-se este biocida, mais uma vez, bastante eficaz na inactivação de todos estes vírus (Sanekata, *et al.*, 2010).

Miura & Shibata (2010), fizeram um estudo para aferir a eficácia deste biocida no vírus influenza. Obtendo com os seus resultados a confirmação de que a solução de  $\text{ClO}_2$ , sendo usada em caso de infecção por contacto com o vírus influenza, demonstra 10 vezes mais actividade antiviral do que a solução de hipoclorito de sódio, sendo que ambos são compostos lixiviados compostos por cloro. O  $\text{ClO}_2$  demonstrou ainda uma

actividade vírucida não afectada pela presença de matéria orgânica, nem pelo aumento da concentração de sais, ou variações de temperatura ou pH.

Neste estudo, foi testada a eficácia do  $\text{ClO}_2$  contra o vírus Influenza, fazendo-se testes em ratos. O teste realizou-se sendo o  $\text{ClO}_2$  gasoso aplicado em 15 ratos numa gaiola semi-fechada, com concentração média final de 0,032ppm, por 15 min, e foi simultaneamente introduzido 1 aerossol com vírus influenza, próximo da dose letal ( $\text{LD}_{50}=1$ ), através de nebulizador. Ao grupo controlo não se adicionou  $\text{ClO}_2$  gasoso, mas sim ar puro. Após 3 dias, retiraram-se 5 ratos para controle através de titulação do vírus a nível pulmonar. Nos ratos controlo era  $6,7 \pm 0,2$  log, enquanto que, no grupo tratado era inferior a  $2,6 \pm 1,5$  log. Logo, uma quantidade muito maior de vírus estava presente no grupo controlo do que no grupo tratado com aerossol de  $\text{ClO}_2$  gasoso.

Quando se comparou a mortalidade em 16 dias, dos dois grupos, viu-se que no grupo controlo morreram 7 de 10 ratos, enquanto que, do grupo tratado não morreu nenhum. Pode assim sugerir-se que 0,03ppm de  $\text{ClO}_2$  previne a infecção do vírus influenza, especificamente.

Foi ainda também aferido, o  $\text{ClO}_2$ , num estudo com humanos que envolveu uma sala de aula com  $230\text{m}^3$ . Utilizou-se uma pulverização de 0,01-0,03ppm de  $\text{ClO}_2$ . Quando este não foi utilizado, o absentismo durante 38 dias consecutivos foi 4%, quando se utilizou  $\text{ClO}_2$  o absentismo foi reduzido para 1,5%. O primeiro motivo para justificar o absentismo escolar era constipação, ou especificamente, contaminação com o vírus Influenza.

De ambos os estudos, e de acordo com os resultados, foi concluído que baixas concentrações de  $\text{ClO}_2$  gasoso previnem a infecção por vírus Influenza em espaços semifechados (Miura & Shibata, 2010).

Zoni e colaboradores (2007), estudaram também a eficácia de  $\text{ClO}_2$  no Calicivírus felino, vírus Coxsachie B5, e o vírus da Hepatite A. Concluindo que, o  $\text{ClO}_2$  não só é um excelente agente bactericida, como vírucida de eleição, pois inactivou todos os vírus testados.

Foi possível determinar que, a uma concentração superior a 0,6mg/L, este composto inactiva rapidamente o vírus da Hepatite A e o Calicivírus felino. Sendo que,

no caso do Coxsackie B5 verificou-se que este revela sensibilidade a todas as concentrações utilizadas (Zoni, *et al.*, 2007).

J. W. Li e colaboradores (2004), verificaram e concordaram que o vírus da Hepatite A é inativado pelo  $\text{ClO}_2$ . Este danifica o genoma deste vírus, mas também reage com a cápside proteica, inibindo-o assim de se ligar às células hospedeiras, dado que este fica impedido de se revestir, não conseguindo penetrar nestas (J. W. Li, *et al.*, 2004).

Hornstra, Smeets, & Medema (2011), realizaram estudos no MS2. Este é um bacteriófago utilizado, normalmente, como modelo para vírus entéricos, porque tem uma morfologia semelhante a esses vírus. É, ainda, relativamente resistente à desinfecção, quando comparado a vírus humanos patogénicos

O  $\text{ClO}_2$  demonstrou inativar o MS2, pelo menos em 5 logs, com uma concentração de 0,5mg/L, ou ainda 0,02mg/L. Portanto, é bastante eficaz mesmo a baixa concentração (Hornstra, Smeets, & Medema, 2011).

#### **4.4.1- Fenómenos associados à desinfecção de vírus pelo Dióxido de Cloro**

Os vírus demonstram, normalmente, um aumento de resistência à desinfecção pelo  $\text{ClO}_2$ , que aumenta de acordo com o prolongamento do tempo de desinfecção. Normalmente, nunca se levantam muitas questões a este fenómeno, no entanto, esta desvantagem pode levar à má desinfecção de água ou alimentos, desencadeando depois problemas para o consumo humano.

Este fenómeno é denominado como “*tailing*”, ou seja, à medida que a desinfecção continua, os vírus alteram a sua forma, criando uma estrutura semelhante a uma cauda, que lhes permite resistir melhor à desinfecção. Normalmente, quem verifica tal alteração estrutural dos vírus nunca a leva muito em conta, ou então apenas as considera meros artefactos. No entanto, este fenómeno parece ter especial relevância sendo bastante comum, sobretudo, em desinfecções com  $\text{ClO}_2$ . Exemplos de vírus que o desencadeiam são Adenovírus, Calícivirus felino, Enterovírus 71, Norovírus de murinos e Rotavírus humano e símio. No entanto, a existência deste fenómeno não é mencionada a maioria das vezes, ou apenas se atribui a diminuição da eficácia de desinfecção com  $\text{ClO}_2$  ao decaimento da concentração do mesmo, ao longo do tempo (Hornstra *et al.*, 2011; Sigstam *et al.*, 2014).

Sigstam e colaboradores (2014), verificaram este fenómeno no bacteriófago MS2, tentando esclarecer se o fenómeno ocorre pela presença de agregados virais, por alterações de propriedades da solução, diminuindo assim a eficiência do  $\text{ClO}_2$ , ou por alterações no próprio vírus que o levem a criar uma protecção contra o  $\text{ClO}_2$ . Isto levou-os a concluir que a causa principal para o fenómeno, durante esta desinfecção, foi a alteração das propriedades do vírus, revelando, mais especificamente, que a reacção do  $\text{ClO}_2$  com o MS2 cria produtos que se depositam no vírus e o protegem da restante desinfecção. A cápside proteica do exterior do vírus torna-se extensiva e reversivelmente alterada durante o processo de desinfecção. Qualquer outro motivo especulado para este fenómeno foi colocado de parte, pois não existiram provas que os comprovassem.

Este efeito limitado de desinfecção do  $\text{ClO}_2$  deve ser controlado e conhecido por qualquer operador que tenha a intenção de utilizar este biocida, pois este fenómeno deve ser tido em conta, dado que pode prejudicar a desinfecção. Pode, ainda, tentar adicionar-se, a estas soluções, partículas com mais afinidade para os produtos que se depositam no vírus evitando que estes ali se depositem e impeçam uma desinfecção eficaz (Sigstam *et al.*, 2014).

#### **4.5- Eficácia do Dióxido de Cloro contra protozoários**

Ruffell, Rennecker, & Mariñas (2000), estudaram a acção do  $\text{ClO}_2$  no *Cryptosporidium parvum* e revelaram que este inactivou em, aproximadamente, 99% o mesmo, não se revelando significantes as variações de pH, pois estas apresentaram pouco efeito aquando da inactivação deste protozoário. No entanto, este composto apresentou maior eficácia na inactivação quando se induziu a diminuição da temperatura. Assim, o  $\text{ClO}_2$  foi eficaz contra protozoários, não se verificando alteração da sua desinfecção com as variações de pH, mostrando-se apenas benéfico a redução de temperatura (Ruffell, Rennecker, & Mariñas, 2000).

Este biocida, também demonstra eficácia no protozoário Giardia, a pH 6 e temperaturas entre os 1 e 25°C, este composto reduz em 3 logs a quantidade deste microrganismo, em concentrações de 1,5 a 2 mg/L. Dependendo das temperaturas e pH, o *Cryptosporidium* já demonstrou ser entre 8 a 16 vezes mais resistente que a Giardia à desinfecção com  $\text{ClO}_2$  (“EPA Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants,” 1999).



## **Capítulo 5 - Dióxido de cloro aplicado na água**

Desde o início do século XX, quando este foi pela primeira vez utilizado num *Spa* em Ostend na Bélgica, que foi atribuído ao  $\text{ClO}_2$  o seu reconhecimento como desinfectante, bastante eficaz para aplicar na água. Durante o ano de 1950, este passou a ser bastante utilizado como desinfectante para a água de consumo humano, apresentando inúmeras vantagens em relação aos desinfectantes previamente usados, produzindo menos alterações organolépticas e uma maior eficácia durante um menor espaço de tempo, ou mesmo menores quantidades de desinfectante (“EPA Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants,” 1999).

O  $\text{ClO}_2$  é uma alternativa ao cloro, pois as suas reacções com a matéria orgânica e inorgânica não levam à formação de compostos tóxicos, como já referido, sendo que, este é inclusive um biocida mais eficaz no tratamento de águas, devido à sua maior capacidade oxidante.

O  $\text{ClO}_2$  aceita 5 electrões quando reduzido a cloro, baseado na sua estrutura molecular, e número de electrões transferidos o  $\text{ClO}_2$ , tem aproximadamente 263% mais disponibilidade, o que é mais do que 2,5 vezes a capacidade oxidante do cloro, quer o cloro esteja na forma de ácido hipocloroso, ou apenas na forma de cloro molecular (Ayyildiz, Ileri, & Sanik, 2009).

O poder da desinfecção com o  $\text{ClO}_2$  continua a ser superior a muitos outros desinfectantes, como é também no caso do hipoclorito de cálcio, quando para tratamento da água. O hipoclorito de cálcio, tal como apenas a utilização de cloro, leva ao aumento da formação de trihalometanos, como produtos da sua desinfecção, excedendo os valores limite. O  $\text{ClO}_2$ , produz cloreto e clorato, mas continua a conseguir-se uma desinfecção segura e eficaz nas condições testadas por Ufermann, Petersen, & Exner (2011), sendo uma boa alternativa ao hipoclorito de sódio (Ufermann, Petersen, & Exner, 2011).

A eficácia do  $\text{ClO}_2$  para matar microrganismos patogénicos depende de um variado número de factores, tais como dose desinfectante, tempo de contacto, temperatura da água, pH, total de sólidos suspensos e quantidade de matéria orgânica presente. Geralmente, o aumento da temperatura da água, aumento das doses de desinfectante, e aumento do tempo de contacto favorecem a inactivação de

microrganismos, a um pH entre 3 e 9, enquanto que, a concentração de sólidos suspensos e matéria orgânica diminui significativamente a eficácia da desinfecção.

Os sólidos em suspensão na água dificultam a desinfecção da mesma pois prendem alguns microrganismos, e fazem com que estes sobrevivam mesmo após o processo de desinfecção. Tal como os compostos orgânicos, como por exemplo grupos funcionais sulfúricos, fenólicos ou aminas presentes na água, que acabam por reagir com o desinfectante. A diminuição do poder desinfectante, do  $\text{ClO}_2$  na água tem sido, portanto, em grande parte atribuída à oxidação deste pelos compostos orgânicos.

A aplicação de um processo de eliminação dos sólidos suspensos na água e compostos orgânicos que anteceda o processo de desinfecção da água, é um passo importante para o sucesso desta (Ayyildiz et al., 2009).

O  $\text{ClO}_2$  emergiu como uma alternativa atractiva para desinfectante da água, capaz de eficazmente inactivar os microrganismos patogénicos, mesmo aqueles com elevada resistência ao cloro. Sem formar resíduos halogenados, o que limitava a segurança ambiental do cloro aquando da desinfecção da água.

De acordo com Xue e colaboradores (2013), foi demonstrada a eficácia do  $\text{ClO}_2$  num dos vírus que mais contamina a água, o Rotavírus, que causa graves infecções em humanos através desta via de contaminação. Foi demonstrado que, o  $\text{ClO}_2$  é eficaz contra o Rotavírus, sendo este rapidamente inactivado no primeiro período e depois a menor velocidade com o aumento do tempo de exposição. As concentrações iniciais eram de 0,1mg/L e verificou-se uma redução de 4 logs na quantidade do Rotavírus, em aproximadamente 60 minutos de tempo de contacto. No entanto, o  $\text{ClO}_2$  não mostrou afectar o genoma do Rotavírus para gerar a sua inefetividade (Xue et al., 2013).

Sun e colaboradores (2007), também estudaram a inactivação de *Chironomidae larvae* pelo  $\text{ClO}_2$ , atribuindo-lhe melhor eficiência do que o cloro. Este não foi afectado pelo pH entre 6 a 8, mas apresentou um menor poder de desinfecção quando o seu pH é superior a 10. No entanto, com o aumento da matéria orgânica, verificou-se uma diminuição do seu poder de inactivação de *Chironomidae larvae*, sendo que, o poder de inactivação melhora a uma temperatura entre os 10 e os 25°C (Sun et al., 2007).

Yang, Guo, & Lee (2013), verificaram ainda que, ao utilizar a desinfecção da água com  $\text{ClO}_2$ , este não gera uma quantidade significativa de trihalometanos ou ácidos

haloacéticos, no entanto, o cloro proveniente da degradação do  $\text{ClO}_2$  pode gerar alguns, sendo que, é posteriormente convertido a clorito e clorato (Yang, Guo, & Lee, 2013).

Sendo que, o cloro produzido pela degradação do  $\text{ClO}_2$  é o responsável por este ainda produzir alguns triclorometanos, calculando-se a hipótese do  $\text{ClO}_2$  poder ser tão prejudicial quanto o cloro. No entanto, isto não se verifica, pois a dose de cloro produzida da decomposição do  $\text{ClO}_2$  é baixa, assim os triclorometanos não afectam a segurança da desinfecção, podendo utilizar-se o  $\text{ClO}_2$  na desinfecção da água, de forma segura (S. Li *et al.*, 2013; H.-S. Shin & Jung, 2006).

Em média, a conversão do  $\text{ClO}_2$  a clorito após a desinfecção, estima-se ser de aproximadamente 68%, enquanto que, de clorato se estima que seja aproximadamente apenas 9%. Estes produtos, também podem ter consequências para a saúde humana, pois a exposição humana a clorito e clorato, leva a mudanças nos glóbulos vermelhos, dado que, estes provocam *stress* oxidativo.

Para reduzir os produtos da desinfecção com  $\text{ClO}_2$  deve-se, após a desinfecção da água, proceder a passos como coagulação e floculação. Ainda mais eficaz e efectivo se mostrou o carbono activado em pó. Este consegue reduzir os produtos da desinfecção da água com  $\text{ClO}_2$  em aproximadamente 50% (Korn, Andrew, & Escobar, 2002; Sorlini, *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2007).

Sendo assim, este foi aprovado para o tratamento de águas desde que se verificou que o cloro e outros produtos semelhantes, como referido anteriormente, formavam trialometanos e produtos secundários provenientes da sua desinfecção, pois estes produtos são associados ao aumento de risco cancerígeno. O dióxido de cloro, começou a ser então utilizado numa pré desinfecção e na desinfecção final de águas. Usa-se com muita frequência no pré-tratamento, pois remove com elevada eficácia os compostos de manganês e de ferro, funcionando como agente floculante. Remove ainda, o cheiro e sabor indesejáveis presentes na água. Sendo que, mesmo após o tratamento, promove a desinfecção no interior dos sistemas de distribuição (“EPA Guidance Manual Alternative Desinfectants and Oxidants,” 1999; H.-S. Shin & Jung, 2006).

### **5.1 Dióxido de cloro utilizado no controlo de sabor e odor da água**

Uma das vigentes aplicações do  $\text{ClO}_2$  na água potável, é o seu controle de sabor e odor, sendo este associado à decomposição da vegetação ou à presença de algas. O

$\text{ClO}_2$  é também eficaz a remover o sabor e odor produzindo (produzidos por) compostos fenólicos. As recomendações para tratamento com  $\text{ClO}_2$  irão depender da qualidade da água em causa, do tipo de plantas a tratar, ou de qualquer outro propósito para adição do  $\text{ClO}_2$ .

Nos tratamentos convencionais de plantas na água, é recomendado que o  $\text{ClO}_2$  seja adicionado perto do final da desinfecção, ou a seguir à sedimentação. No caso da turvação da água ser baixa, o  $\text{ClO}_2$  pode ser utilizado no início, assim que se verifica crescimento de plantas.

O  $\text{ClO}_2$  é eficaz para controlar o crescimento de algas na floculação e sedimentação, mas este procedimento normalmente é realizado sob exposição à luz solar. No entanto, se tais aplicações forem realizadas em períodos de ausência de luminosidade, podem apresentar melhor taxa de sucesso no controlo desta praga (“EPA Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants,” 1999).

## **5.2 Dióxido de cloro utilizado no controlo do ferro e manganês na água**

O  $\text{ClO}_2$  pode ser utilizado para oxidar ambos, tanto o ferro, como o manganês. O  $\text{ClO}_2$  reage com formas solúveis destes compostos, formando precipitados que podem ser removidos através de sedimentação e filtração.

O  $\text{ClO}_2$  reduz-se ao ião clorito nesta reacção. Aproximadamente 1,2 mg/L de  $\text{ClO}_2$  são necessárias para remover 1mg/L de ferro e 2,5mg/L de  $\text{ClO}_2$  são necessárias para remover 1mg/L de manganês. Quando se verifica uma elevada concentração de ferro ou manganês na água, o uso de  $\text{ClO}_2$  é limitado a 1,0mg/L, para prevenir a produção de compostos como o clorito e clorato, provenientes da sua oxidação. O ião ferroso pode ser adicionado no início da reacção, para promover coagulação, resultando assim numa redução do ião clorito (“EPA Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants,” 1999).

## **Capítulo 6- Dióxido de Cloro aplicado a alimentos**

As aplicações do  $\text{ClO}_2$  são as mais variadas, uma delas é a que será abordada neste capítulo, a sua aplicação nos alimentos, sendo esta aplicação de grande relevo, nas mais variadas vertentes e em vários contextos.

A sua utilização na indústria alimentar insere-se num vasto campo de aplicações, e tem-se mostrado uma ferramenta importante na destruição de microrganismos, assegurando a qualidade e preservação dos alimentos, aumentando o tempo de duração dos mesmos, sendo ainda, aplicado na desinfecção de equipamentos e áreas de trabalho, na eliminação de sabores indesejáveis produzidos por bactérias durante o armazenamento dos alimentos. Pode ainda, ser aplicado na remoção de pesticidas ou mesmo no controle da alteração de coloração de alimentos.

A utilização de biocidas nos alimentos enfrenta vários desafios, como são o caso dos constituintes desses mesmos alimentos, da localização onde os microrganismos se encontram, o processamento que os alimentos sofrem nas várias etapas, e a sua durabilidade até ao consumo. Os alimentos frescos passam em geral por processos de colheita, lavagem, e armazenamento, podem ser seccionados ou partidos, centrifugados, e embalados. Processos que envolvam seccionamento, levam a aumento da área de tecido disponível dos alimentos, tornando mais viáveis possíveis infecções microbianas, o rompimento de tecidos resulta no aumento da respiração celular, promovendo uma mais rápida deterioração.

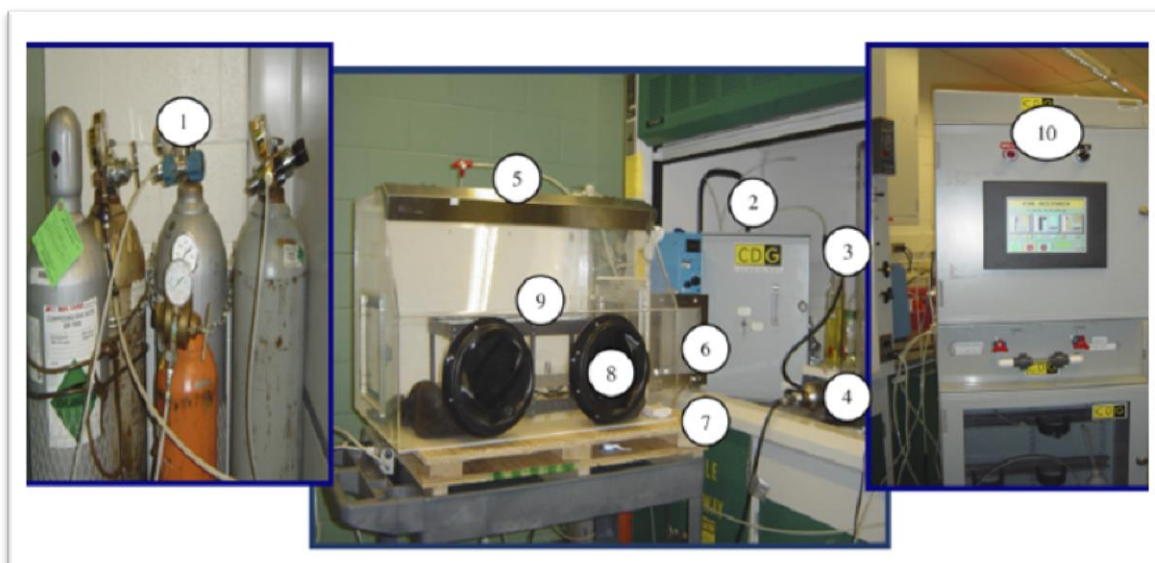
Os microrganismos, podem localizar-se nos alimentos em superfícies lisas e de fácil acesso, localizar-se em superfícies rugosas, irregulares, no interior dos mesmos ou ainda a formar biofilmes. Por todas estas razões, a desinfecção dos produtos alimentares com um biocida apropriado, da água em contacto com estes, dos equipamentos para o seu processamento, e mesmo de quem os manipula, deve ser tida em conta (Chung, Huang, & Yu, 2011).

O biocida anteriormente mais utilizado na produção e embalamento de produtos frescos era o cloro, normalmente sob a forma de hipoclorito de sódio, vulgarmente designado por lixívia. O cloro dissocia-se em água a ácido hipocloroso, ou a ião hipoclorito, dependendo do pH da solução. A forma biocida do cloro é o ácido hipocloroso, e o pH das soluções deve ser bem controlado para garantir e manter níveis

adequados deste biocida. Uma das desvantagens do cloro é que este consegue reagir mesmo com quantidades vestigiais de matéria orgânica, muito frequente nos produtos frescos e formar potenciais produtos carcinogénicos proveniente desta mesma reacção, originando produtos organoclorados. Mostrou-se então necessário encontrar alternativa para este biocida, no sentido evitar tais complicações e posteriormente aplicá-lo aos dilemas da indústria alimentar.

Tendo assim papel o  $\text{ClO}_2$ , um biocida com actividade mais poderosa que o anterior, cerca de 2,5 vezes mais capacidade de oxidação que o cloro, como já referido. Em contraste com o cloro, o  $\text{ClO}_2$  é eficaz a uma grande variação de pH e não reage com a água, permanecendo um gás dissolvido quando em contacto com a água. Além disso, o  $\text{ClO}_2$  não reage com a amónia portanto não forma cloraminas, nem forma trihalometanos na presença de matéria orgânica (da degradação do  $\text{ClO}_2$  pode resultar cloro, que irá residualmente reagir com a matéria orgânica ou com a amónia, no entanto, não é significativo).

Até há uns anos atrás as melhores recomendações para obter o  $\text{ClO}_2$  gasoso seriam o de o produzir no local, onde se destinava a sua aplicação, como é possível visualizar na figura 3, no entanto hoje em dia já existem diversos métodos para a produção do  $\text{ClO}_2$ , alguns deles envolvendo a mistura de  $\text{ClO}_2$  com alguns ácidos para estabilizar a solução, não sendo, no entanto, consideradas estas soluções como de facto puras, ou seja, com conteúdo exclusivo apenas em  $\text{ClO}_2$ . Mas têm completa capacidade biocida, para uma desinfeção eficiente (Chung *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Sistema exemplo para gerar  $\text{ClO}_2$  no local de aplicação destinado a desinfetar pequenos espaços com tratamento de fluxo contínuo. (1) gás de cloro; (2) gerador de dióxido de cloro gasoso; (3) solução de cloreto de sódio; (4) válvula do gás de dióxido de cloro; (5) câmara de tratamento; (6) entrada e saída de amostras; (7) medidor de humidade relativa; (8) luvas de trabalho; (9) ventiladores; (10) monitor com o controlo do gás de dióxido de cloro utilizado. (Adaptado de: B S M Mahmoud & Linton, 2008)

O  $\text{ClO}_2$ , é o presente biocida mais utilizado para controlar o crescimento microbiano na indústria alimentar. Nos Estados Unidos, a *Environmental Protection Agency*, em 1967, aprovou pela primeira vez a sua utilização como desinfetante para a água potável a uma concentração máxima de 0,01ppm na água após o tratamento. Sendo que, também a *Food and Drug Administration* em 1995 regulou a sua utilização, determinando, que após a sua desinfecção os produtos deveriam apresentar uma percentagem inferior a 5% de impurezas, bem como quando utilizado como biocida na água para o processamento de carnes de aves, considerando-se para estas um nível de resíduos de aproximadamente 3ppm deste desinfetante. O  $\text{ClO}_2$  recebeu mais atenção como biocida quando aplicado a vegetais e alimentos frescos, porque a sua eficácia é menos afectada pelas variações de pH, ou pela presença de matéria orgânica, e este não reage com a amónia ou compostos orgânicos, como os anteriores biocidas já referidos, apresentando-se uma enorme vantagem para a sua aplicação nesta área(Chung *et al.*, 2011).

Devido à capacidade do  $\text{ClO}_2$  poder ser utilizado na forma gasosa, este terá maior capacidade de chegar a áreas menos acessíveis, comparativamente à sua forma aquosa, e é considerado mais efectivo sobretudo na desinfecção das superfícies em

contacto com alimentos. O seu gás no entanto é facilmente dissolvido em água, e desta forma também se torna um bom biocida para utilizar nos alimentos, e na desinfecção de equipamentos necessários ao processamento destes (J.-M. Kim & Linton, 2008).

### 6.1- Controlo microbiológico com dióxido de cloro nos alimentos frescos

Em geral, o consumo de vegetais e frutas frescas revelou um aumento bastante significativo nos últimos anos, devido ao seu efeito benéfico, e o seu reforço bastante positivo para a saúde e bem-estar. No entanto, estes são os produtos que podem com mais facilidade ser contaminados por microrganismos contaminantes dos alimentos. Os surtos de infecções com microrganismos presentes nos alimentos, são normalmente associados a fruta e vegetais frescos. Como tal, têm sido isolados destes alimentos microrganismos como *Aeromonas*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *Clostridium botulinum*, *Escherischia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, entre outros.

Microrganismos como o *Alicyclobacillus acidoterrestris*, são formadores de esporos, cujo crescimento está definido a valores de pH entre 2,5 e 6. Este, costuma estar presente quando ocorre deterioração de sumos de frutas, havendo registos desta contaminação em diferentes países. Este microrganismo, normalmente, sobrevive à pasteurização dos sumos de fruta, acabando por germinar, desenvolver-se e provocar deterioramento dos produtos. São factores indicativos deste deterioramento a presença de cheiros fenólicos, sendo que o produto poderá apresentar aparência normal, ou verificar-se a presença de pequenos sedimentos. Deve assim, para se reduzir a possibilidade de contaminação do sumo, submeter a fruta a um processo de lavagem, antecedente ao seu processamento a sumo.

Lee e colaboradores (2006), realizaram um estudo com este microrganismo presente em maçãs. Testaram 10 mg de  $\text{ClO}_2$ , durante 2 horas, nos esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, daí foi possível retirar que estes foram reduzidos em larga escala. Posteriormente, testaram o biocida  $\text{ClO}_2$  para remover *Alicyclobacillus acidoterrestris* durante o armazenamento das maçãs, verificando-se que quando este era utilizado a concentrações elevadas de uma única vez as maçãs acabavam por apresentar pequenos pontos pretos na casca (como é possível visualizar na figura 4), no entanto se a concentração de  $\text{ClO}_2$  fosse mais baixa, elas não apresentariam quaisquer pontos, sendo igualmente eficaz a sua desinfecção, durante o armazenamento, utilizando essas



baixas concentrações para controlar o desenvolvimento do microrganismo. Sendo assim, seria preferível menores concentrações de  $\text{ClO}_2$  para evitar as alterações no aspecto visual das maçãs, no entanto se estas fossem apenas destinadas para fazer sumo, não teria qualquer tipo de implicação. As manchas no exterior das maçãs apenas se revelaram uma alteração estética, podendo apenas ser prejudicial para a venda das mesmas, pois acabariam por se tornar menos estéticas aos olhos do consumidor deste produto (Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004).



**Figura 4:** Fotografia digital das maçãs estudadas (A) após tratamento de 7 dias com  $\text{ClO}_2$  gasoso a baixas concentrações, (B) utilizou-se tratamento de média concentração com  $\text{ClO}_2$  gasoso por 3 dias a  $4^\circ\text{C}$ , enquanto que, (C) se utilizou tratamento a alta concentração de  $\text{ClO}_2$  gasoso por 3 dias com  $\text{ClO}_2$  a  $4^\circ\text{C}$ . Em todas as imagens há foto de maçãs do grupo de controlo e maçãs tratadas por tempos de 30 minutos, 1 e 3 horas. Imagem adaptada de: (Lee *et al.*, 2006)

Os morangos, são outro fruto bastante popular e atractivo, devido ao seu elevado apelo visual e sabor característico, sendo um dos frutos mais procurados durante a sua estação. Estes, são uma boa fonte de vitaminas, minerais e antioxidantes naturais, ajudando o organismo a combater algumas doenças, inclusive o *stress*. Contudo, os morangos são altamente susceptíveis a deformações mecânicas, alterações fisiológicas, contaminações fúngicas ou perdas de água. Sobretudo, perdem a sua qualidade via alteração de coloração e alteração de sabor. O seu curto prazo de conservação após a

colheita limita a sua permanência no mercado dos frescos, e consequente acesso dos consumidores.

Sendo que, o  $\text{ClO}_2$  não gera produtos da sua decomposição prejudiciais aos humanos e ainda possui uma actividade biocida superior, comparativamente com o cloro, como já referido. Parece uma boa alternativa para prolongar o tempo e qualidade de permanência dos morangos no mercado.

Aday & Caner (2014), combinaram tratamentos e determinaram qual o tratamento mais eficaz para evitar a deterioração dos morangos. Verificaram que, como tratamento individual o biocida que apresentou melhores resultados foi o  $\text{ClO}_2$ , e ainda como tratamento combinado, a utilização de ultra-sons com desinfectantes, incluindo-se o  $\text{ClO}_2$ . A técnica mais promissora, e que garantiu um maior prolongamento das qualidades dos morangos após a sua colheita, foi assim, a técnica de desinfecção combinada (Aday & Caner, 2014).

De acordo com, Barakat S M Mahmoud e colaboradores (2007), que estudaram também esta fruta. Determinaram que, o biocida  $\text{ClO}_2$  no estado gasoso destrói com eficácia microrganismos como *Escherischia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*. Este gás, demonstrou inactivar de forma eficaz os microrganismos seleccionados e ainda a microflora natural dos morangos (Barakat S M Mahmoud *et al.*, 2007).

Y.-J. Shin e colaboradores (2012), referem que após a colheita de morangos, a aplicação de um tratamento com 50ppm de  $\text{ClO}_2$ , mais  $5\text{KJ/m}^2$  de radiação ultravioleta C, como uma técnica bastante eficaz para manter a qualidade deste fruto, durante o seu armazenamento e aumenta o seu tempo após colheita, aproximadamente por um período de dois dias (Y.-J. Shin, Song, & Song, 2012).

A fruta está susceptível à contaminação natural proveniente de diversas fontes, sejam elas insectos, pássaros, água ou outra qualquer fonte, durante o seu processo de crescimento, amadurecimento e colheita. No entanto, a maioria dos comuns microrganismos encontrados na fruta são considerados benignos, a contaminação com microrganismos provenientes de humanos ou plantas, contudo, apresentam um desafio mais persistente e complicado, para a indústria que desempenha funções no mercado dos alimentos frescos. Processos de embalagem inadequados, ou mesmo uma higiene

precária podem levar a disseminação de microrganismos, originando sérias crises de contaminação cruzada.

Por exemplo, no caso de tomates crus contaminados, estes têm desencadeado surtos bastante graves de salmonelose nos últimos anos. Normalmente, encontram-se contaminados com *Salmonella enterica*, ou com *Erwinia carotovora*. Este último, normalmente, surge por operações durante a colheita, neste procedimento podem provocar-se danos ou rasgos no tomate e daí o microrganismo encontra a sua porta de entrada, contaminando esta fruta.

Estudos desenvolvidos por, Pao e colaboradores (2007), revelam que o  $\text{ClO}_2$  tem uma excelente eficácia contra as espécies *Salmonella enterica* e *Erwinia carotovora*, presentes na água. No entanto, quando aplicaram este biocida na desinfecção de tomates, verificaram que ele apenas apresentava boa efectividade enquanto estes ainda se encontravam molhados, após pouco tempo de secagem a utilização de  $\text{ClO}_2$  não se mostrava mais eficaz do que uma simples lavagem com água (Pao, Kelsey, Khalid, & Ettinger, 2007).

López-Velasco e colaboradores (2012), também estudaram o efeito do  $\text{ClO}_2$  na água usada em tomates frescos, de acordo com a sobrevivência da *Salmonella enterica*, e ainda os efeitos do  $\text{ClO}_2$  na turvação da água de acordo com a variação de temperatura, e respectiva qualidade da mesma. Estes concluíram que, a temperatura pode afectar os níveis residuais do biocida na água, e os resultados indicam que o  $\text{ClO}_2$  é eficaz para reduzir os microrganismos, mesmos estes estando com num nível de contaminação elevado. No entanto, também verificaram que, os tanques de embalamento podem atingir turvações elevadas durante as operações diárias, e a adição deste desinfectante regularmente para prevenir esta turvação não será suficiente, portanto, este não conseguiu prevenir a contaminação cruzada de plantas e microrganismos provenientes da manipulação humana (López-Velasco, Tomás-Callejas, Sbodio, Artés-Hernández, & Suslow, 2012).

A alface é também um importante componente de uma dieta saudável. Contém antioxidantes fenólicos, flavonóides, vitaminas A, K e C, além de minerais como o cálcio, o potássio e o ferro. Dado que, cada vez mais o seu consumo aumenta, aumentou também os relatos de contaminações com microrganismos durante a produção da alface.

As contaminações provem de várias fontes, tais como a água da rega, os fertilizantes, equipamento em contacto com estas, ou mesmo trabalhadores.

Os microrganismos mais reportados como responsáveis por várias hospitalizações associadas ao consumo alface foram *Escherischia coli O157:H7* e *Salmonella enterica*. Mahmoud & Linton (2008), estudaram o efeito do biocida  $\text{ClO}_2$  no estado gasoso para inactivar estes microrganismos, durante o armazenamento da alface, verificando propriedades como a manutenção das qualidades da alface, bem como a preservação das suas propriedades. Do seu estudo pôde ser concluído que, o tratamento mais eficaz para eliminar as bactérias escolhidas foi a utilização de  $\text{ClO}_2$  gasoso em elevadas concentrações, por um tempo mais prolongado, sendo isso correspondente a uma concentração de 5,0mg/L por 10 minutos. Contudo, o  $\text{ClO}_2$  mostrou-se menos eficaz para remover microrganismos nas folhas da alface do que em qualquer outro alimento testado, embora qualquer outro desinfectante também se tenha mostrado menos eficaz quando aplicado às folhas de alface, talvez devido à irregularidade das suas superfícies, sendo de todos os biocidas o  $\text{ClO}_2$  gasoso o mais eficaz (B S M Mahmoud & Linton, 2008).

Os pimentos são também bastante importantes, tanto a nível comercial como nutricional, devido ao seu elevado teor em vitaminas. Contudo, sofrem dos mesmos problemas atribuídos aos legumes ou frutos frescos, a sua conservação é difícil, devido a contaminações que podem surgir por microrganismos, acabando estes por perder os seus nutrientes ou mesmo sofrer uma rápida perda de forma ou conteúdo.

Referindo Jin-Hua & Mao-Run (2007), que estudaram a eficácia do  $\text{ClO}_2$  para manter e controlar as características dos pimentos. Este composto consegue efectivamente atrasar as suas transformações fisiológicas, mantendo as suas características organolépticas por mais tempo, sendo que, em paralelo mantém ainda os seus teores de clorofila estáveis durante mais tempo (Jin-Hua & Mao-Run, 2007).

Quando se compara o  $\text{ClO}_2$  com outro biocida muito utilizado também na indústria alimentar, como por exemplo o hipoclorito de sódio, verifica-se que este não só é bem mais eficaz na sua capacidade como biocida bem como produz muito menos resíduos da sua desinfecção, como já referido. Chung e colaboradores (2011), estudaram estes dois biocidas em seis tipos diferentes de vegetais acabados de cortar e frutas, tais como pepino, alface, cenouras, maçãs, tomate e goiaba. Ainda, testaram e compararam,

a diferença entre vegetais e frutos tratados e não com  $\text{ClO}_2$ , quanto à presença de potenciais produtos carcinogénicos provenientes de resíduos da degradação destes biocidas.

Concluíram que, uma solução concentrada a 100 ppm de  $\text{ClO}_2$  reduz todas as bactérias, nomeadamente coliformes. Atingindo reduções de 3,5 a 4 log de UFC/g na alface, na cenoura, e nos tomates, e apresentando-se bem melhor que o hipoclorito de sódio. O método de lavagem foi considerado melhor do que apenas mergulhar os vegetais e frutos no desinfectante. A desinfecção com hipoclorito de sódio após análise em espectrofotometria de massa mostrou formação de trialométanos na ordem das centenas, enquanto que, quando se analisou a desinfecção com  $\text{ClO}_2$  este apenas revelou a presença de trialométanos na ordem das dezenas. Sendo que, ambos os biocidas para este teste de resíduos foram utilizados a uma concentração de 200ppm, o  $\text{ClO}_2$  mostra um resultado bem menor, e portanto, bem mais positivo para evitar o consumo destes resíduos carcinogénicos (Chung *et al.*, 2011).

Outro alimento bastante importante e de referenciar são as batatas, estas são armazenadas durante longos períodos de tempo para garantir as suas quantidades a níveis regulares ao longo de todo o ano, mas revelam elevada tendência para contaminações por microrganismos. Durante a colheita, estas podem ser contaminadas tanto por matéria orgânica, como por microrganismos patogénicos, podendo mesmo ficar danificadas e passar a ter maior susceptibilidade a microrganismos, tais como leveduras, bolores e bactérias. Quando armazenadas, as bactérias e os fungos que podem ter sido introduzidos durante a colheita, podem contaminar um grande número de batatas, pois estas estarão todas em contacto durante o armazenamento, podendo assim, chegar a contaminar-se toda a colheita.

Os tubérculos com uma contaminação severa não só são inutilizados, como poderão arruinar todas as batatas armazenadas. Estas contaminações no armazenamento não são facilmente solucionáveis, então, encontrar formas de as prevenir, evitando que os agentes patogénicos se disseminem para tubérculos saudáveis, é o mais importante. Dado a sua proximidade, durante o armazenamento, será importante inactivar os agentes patogénicos, bactérias decompositoras, fungos, vírus, ou qualquer outro microrganismo, mesmo antes do armazenamento.

Sendo o  $\text{ClO}_2$  gasoso um possível biocida para este tratamento, oferecerá melhor penetração no seu estado gasoso do que em solução, pois poderá alcançar espaços mais pequenos que a forma líquida não será capaz. O tratamento com  $\text{ClO}_2$  aquoso poderá levar à acumulação de vapor nos locais de armazenamento, podendo originar condensação de água, ou mesmo de  $\text{ClO}_2$  na superfície das batatas não favorecendo a sua desinfecção. No entanto, gerar o  $\text{ClO}_2$  gasoso representa o inconveniente de ser relativamente caro, devido à necessidade de instrumentação no local para aplicar o produto, geradores, isoladores entre outros.

Wu & Rioux (2010), estudaram o desenvolvimento de um método simples de  $\text{ClO}_2$  gasoso que pode eficazmente controlar os microrganismos naturais (bactérias, leveduras e bolores) e inocularam a *Pseudomonas aeruginosa* nas batatas para testar a eficácia do biocida. Chegando à conclusão, que este método de desinfecção é eficaz no controlo microbiológico das batatas, protegendo-as contra *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias, leveduras, e bolores. Sem deixar uma grande percentagem de resíduos, e sem comprometer a qualidade visual das batatas (Wu & Rioux, 2010).

Os mirtilos são uma fruta bastante vulnerável a contaminação bacteriana mesmo ainda na plantação, devido ao manuseamento durante o amadurecimento, e à fertilização manual, contudo as doenças atribuídas a microrganismos que podem ser provenientes deste fruto não apresentam muita conexão ao seu consumo.

No entanto, estudando este fruto verifica-se facilidade e rapidez de crescimento microbiano, sendo estes um bom fruto alvo para estudos da aplicação do  $\text{ClO}_2$ . Assim sendo, Wu & Kim (2007), estudaram a eficácia do  $\text{ClO}_2$  aquoso em *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, e *Yersinia enterocolitica*, inoculados na superfície dos mirtilos. Os bolores e as leveduras que naturalmente surgem nos mirtilos também foram investigados.

Estes concluíram que, para o tratamento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* o  $\text{ClO}_2$  não se revelou muito eficaz. Quanto à *Salmonella typhimurium* basta uma concentração de 15 ppm de  $\text{ClO}_2$ , por 20 minutos, para atingir uma boa redução deste microrganismo. De todos os microrganismos testados foi *Yersinia enterocolitica* que apresentou uma maior redução. Quanto ao efeito do  $\text{ClO}_2$  nas leveduras e bolores, o biocida mostra ser eficaz contra estes, a uma concentração de 15ppm durante um tratamento de 1 hora, mesmo as concentrações de  $\text{ClO}_2$  aquoso de 5

ou 10ppm mostram reduções semelhantes, com o mesmo tempo de tratamento. Além disso, o  $\text{ClO}_2$  gasoso mostrou idêntica eficácia na redução destes contaminantes, no entanto o  $\text{ClO}_2$  aquoso mostra sempre uma melhor adequação comercial do que o gasoso, pois como já referido, o seu estado gasoso requer instrumentação no local para administração.

Concluíram ainda que, a degradação do  $\text{ClO}_2$  pela matéria orgânica ao longo do tempo, mostra-se vantajosa para manter as qualidades visuais dos produtos, e a redução dos resíduos provenientes da desinfecção, além disso promove a segurança dos alimentos (Wu & Kim, 2007).

A composição dos próprios alimentos pode influenciar a sua desinfecção, como tal, Latif e colaboradores (2011), estudaram a eficácia do  $\text{ClO}_2$  para inactivar microrganismos de acordo com a interferência da composição dos próprios alimentos nesse processo.

No geral, estes determinaram que, o  $\text{ClO}_2$  apresenta melhor eficácia contra bactérias Gram negativo, leveduras e bolores apresentam uma resistência intermédia, e os esporos de *Bacillus cereus* revelam-se como os mais resistentes a este biocida. Contudo, também *Pseudomonas fluorescens* demonstrou uma resistência anómala ao biocida, sem se conseguir atribuir a este facto nenhuma explicação. Então, estes inferiram que, controlar infecções da espécie *Pseudomonas spp.* com este biocida, pode representar dificuldades acrescidas.

Foi reportado também que, a humidade relativa do ar, a temperatura e a distribuição do gás na câmara, afectam o processo de desinfecção. Verificaram que, as propriedades antimicrobianas do  $\text{ClO}_2$  são altamente afectadas pelas proteínas e gordura presentes nos alimentos a desinfectar. A presença de proteínas reduz significativamente o efeito antimicrobiano do  $\text{ClO}_2$ , pois este biocida reage com a tirosina e o triptofano e com os conteúdos sulfúricos dos aminoácidos de cisteína, bem como com o tripeptido de glutatião, o que resulta na redução de  $\text{ClO}_2$  disponível em solução. Portanto, sempre que existe a presença de alguns destes componentes na comida afecta-se a capacidade de desinfecção do  $\text{ClO}_2$ .

Aparentemente estes revelaram que, o  $\text{ClO}_2$  gasoso será o menos eficaz como agente desinfectante para o processamento de alimentos ricos em proteínas e lípidos tais

como carne e peixe, e será mais eficaz em produtos ricos em hidratos de carbono como produtos de panificação frutas e vegetais. Esporos de bactérias, leveduras, bolores, e *Pseudomonas spp.*, têm um papel relevante na deterioração de alimentos, portanto, longos períodos de tempo de tratamento, ou elevadas concentrações, serão necessários no caso de se utilizar  $\text{ClO}_2$  para inactivar estes microrganismos (Latif, Sherazi, & Bhanger, 2011).

#### **6.1.1- Remoção de pesticidas com dióxido de cloro nos alimentos frescos**

Não só o  $\text{ClO}_2$  é aplicado no controlo microbiológico, como este pode ser útil no mercado dos alimentos noutras vertentes, de forma igualmente eficaz. Sendo uma delas a remoção de pesticidas.

Na China, os pesticidas organofosforados são bastante importantes e utilizados. A sua utilização pode efectivamente prevenir a perda da produção agrícola, contudo é reconhecido que estes podem inibir a actividade da enzima colinesterase, prejudicar a condução nervosa, apresentar toxicidade genética, ou mesmo ser teratogénicos. Os resíduos destes pesticidas, tornaram-se assim, uma preocupação de ordem pública. Então, neste sentido, tornou-se urgente desenvolver métodos de remoção destes pesticidas dos produtos agrícolas.

Como representante dos vegetais, que se pode utilizar de forma mais simplista e consumir cru, pode referir-se a alface, que é possível consumir fresca ou em saladas. Estes pesticidas são com frequência aplicados na alface, para prevenir a sua degradação por insectos durante o seu crescimento.

Chen e colaboradores (2014), estudaram então a efectividade que o  $\text{ClO}_2$  apresentou para remover os resíduos destes pesticidas, em alfaces frescas. Conseguiram então apurar que, o  $\text{ClO}_2$  é eficaz a remover estes resíduos, quando aplicado em solução aquosa. A degradação dos resíduos de pesticida é aumentada, em comparação com uma simples lavagem com água, quando se aplica solução contendo  $\text{ClO}_2$ . A sua degradação também é influenciada pela concentração de  $\text{ClO}_2$ , valor de pH, tempo de tratamento, e concentração inicial de pesticidas.

Definindo então que, a uma baixa concentração inicial de pesticidas e utilizando maiores concentrações de  $\text{ClO}_2$  e tempos de tratamento, resulta numa melhor degradação de pesticida. Sendo que, a pH neutro ou com tampão alcalino são os mais



eficazes para remover os pesticidas, do que a utilização de um pH ácido (Chen *et al.*, 2014).

#### **6.1.2- Controlo de escurecimento dos alimentos frescos com dióxido de cloro**

Outra possível aplicação do biocida  $\text{ClO}_2$ , é quando nos referimos na melhoria das características da fruta ou vegetais, como sendo elas o caso do escurecimento tão típico deste alimento, sobretudo após o seu seccionamento. Esta característica torna estes alimentos menos apetecíveis e com um tempo de disponibilidade ainda menor, levando a grandes desperdícios neste sector e a perda de lucros.

O escurecimento do pericarpo é causado por 2 enzimas em especial, a polifenol oxidase e a peroxidase, que oxidam fenóis a quinonas, e que serão posteriormente polimerizadas para formar o pigmento castanho. Consequentemente evitar o escurecimento da fruta tornou-se importante para melhorar o marketing destes alimentos. Estudos recentes foram realizados no sentido de verificar a eficácia do  $\text{ClO}_2$  para prevenir o escurecimento enzimático e manter a qualidade da fruta e vegetais.

Saengnil e colaboradores (2014), estudaram o escurecimento da fruta e a eficácia em simultâneo do  $\text{ClO}_2$  para combater os microrganismos responsáveis pela decomposição de fruta e vegetais. Concluindo que, a fumigação com  $\text{ClO}_2$  gasoso atrasa significativamente o desenvolvimento de contaminações, demonstrando uma eficácia superior a concentrações que variam entre 10 a 25 mg/L. E verificaram sobre o escurecimento destes produtos frescos, que a fumigação com  $\text{ClO}_2$  se mostra mais eficaz do que a utilização de clorito de sódio. O  $\text{ClO}_2$  diminui a actividade das enzimas responsáveis pelo escurecimento da fruta, em 14% e 40%, acabando por representar uma redução de escurecimento de 85% e promovendo o tempo de disponibilidade da fruta.

Portanto, a fumigação com  $\text{ClO}_2$  de 10mg/L durante 10 minutos tem o potencial de reduzir o escurecimento e ainda, aumentar o tempo de disponibilidade da fruta, estimado em média por mais 5 dias, reduzindo a actividade das enzimas responsáveis pelo escurecimento, bem como mantendo o total de conteúdo fenólico durante o armazenamento (Saengnil *et al.*, 2014).

Chomkitichai e colaboradores (2014), estudaram no mesmo sentido a eficácia do  $\text{ClO}_2$  para reduzir o escurecimento da fruta. Revelando conclusões semelhantes, este

biocida é eficaz para retardar a reacção das enzimas polifenol oxidase e a peroxidase com os compostos fenólicos levando à redução destes, não se promovendo o escurecimento da fruta. Deve-se ao facto de o  $\text{ClO}_2$  poder reagir com as zonas activas dos aminoácidos histidina e cisteína, inibindo as mesmas de catalisar a reacção responsável pelo escurecimento (Chomkitichai *et al.*, 2014).

Chung e colaboradores (2011), verificaram também a capacidade do  $\text{ClO}_2$  para controlar o escurecimento em maçãs e cenouras, acabadas de cortar, mergulhando-as em soluções contendo diversas concentrações de  $\text{ClO}_2$ . Revelando que, os pedaços de maçã tratados com 50ppm de  $\text{ClO}_2$  não mostraram qualquer indício de alteração de cor, já as cenouras tratadas com 200ppm apresentaram alguma alteração (Chung *et al.*, 2011).

## **6.2- Controlo microbiológico com dióxido de cloro nos alimentos minimamente processados**

Os vegetais e frutas, hoje em dia, são preparados para venda de acordo com vários processos. Antes de chegar às nossas mesas são sujeito a processos como seccionamento, lavagem, descascamento, resultando em 100% produto consumível, sendo posteriormente embalado para consumir imediatamente, ou algum tempo depois. Reduzindo desperdícios ao comprador e facilitando o consumo dos produtos, pois cada vez mais os aproxima de pronto a comer e reduz o tempo de manuseamento que seria necessário após a compra.

Quando a indústria começou a fazer estes processamentos um novo tipo de produto foi criado, a que se atribuiu o nome de, vegetais minimamente processados. Vegetais minimamente processados são, qualquer fruta ou vegetal que foi fisicamente alterado da sua forma original, mas permanece com o seu estado de frescura inicial. Contudo, normalmente entre o seu processamento e consumo podem passar alguns dias, e os consumidores continuam a procurar a frescura dos produtos, apesar de estes alimentos passarem a possuir um menor tempo de sobrevivência, do que poderiam ter intactos, quando comercializados na sua forma original.

A indústria teve que se valer das ferramentas que poderia, desde que os métodos de conserva não prejudiquem os alimentos frescos ou os atributos de frescura inerentes a estes alimentos. De forma a impedir que os microrganismos contaminem estes alimentos, a sua proliferação deverá ser controlada mesmo após o seu armazenamento, pode prevenir-se o aumento da contaminação durante esse tempo, utilizando

tratamentos desinfectantes que serão limitados ao seu efeito no produto em causa. Esta descontaminação terá como principais cinco objectivos, tais como, a redução do risco de infecções e intoxicações por microrganismos desenvolvidos em alimentos, a diminuição de deterioração proveniente de microrganismos, a preservação dos atributos da sua frescura, a preservação da sua qualidade enquanto produtos naturais, e a ausência de níveis inaceitáveis de resíduos tóxicos ou a sua formação dentro de níveis aceitáveis.

Para assegurar que o desinfectante realmente actua nos microrganismos, uma boa área de contacto entre os desinfectantes e os microrganismos deve ser assegurada. A maioria dos estudos, realizados sobre controlo de microrganismos, é feita com bactérias inoculadas em superfícies lisas, sendo portanto, bastante facilitado o contacto entre microrganismos e desinfectante. No entanto, os microrganismos podem estar localizados nas superfícies irregulares dos vegetais, por baixo da superfície, fortemente ligados a essas mesmas superfícies, ou sob a sua forma mais complexa, biofilmes, o que torna a actividade do biocida muito mais dificultada. Lavar os vegetais com soluções desinfectantes, tem uma eficácia limitada, devido à superfície hidrofóbica dos vegetais, tornando difícil o contacto necessário, e ainda a matéria orgânica inactiva a maioria dos comuns desinfectantes.

Também será importante quantificar o grau de nutrientes perdidos e se esta perda não será possível de prevenir, especialmente considerando que os vegetais minimamente processados são comprados por consumidores conscienciosos com a sua saúde, que esperam que o produto que pretendem comprar possua as mesmas ou semelhantes qualidades nutricionais do que o produto originalmente não tratado.

Devido ao gás ter uma maior capacidade de penetração em relação ao líquido, o  $\text{ClO}_2$  gasoso, pode novamente ser considerado mais eficaz para a desinfecção de superfícies dos alimentos do que os compostos aquosos.

Como tal, Gómez-López e colaboradores (2008), estudaram o  $\text{ClO}_2$  gasoso, e verificaram se este se mostrava eficaz prolongando a disponibilidade dos alimentos minimamente processados, utilizando como exemplo no estudo a alface e o repolho previamente imersos em solução de L-cisteína com a intenção de inibir o seu acastanhamento durante o tratamento com  $\text{ClO}_2$ .

Deste estudo foi possível concluir que, ao tratar os alimentos com  $\text{ClO}_2$  gasoso houve um decréscimo da microflora dos vegetais, mas potenciou, no entanto, o crescimento dos microrganismos sobreviventes. Sendo que, esta potenciação também ocorreu quando se utilizou outros desinfectantes. Quanto à imersão em L-cisteína, esta mostrou-se eficaz para evitar o escurecimento pelo uso do biocida, no entanto, revelou poder diminuir a capacidade de desinfecção do mesmo, será então necessário encontrar outro agente para evitar o escurecimento dos alimentos, que não interaja com o biocida (Gómez-López *et al.*, 2008).

Gómez-López e colaboradores (2009), focaram-se em estudar o impacto do  $\text{ClO}_2$  na descontaminação microbiana e na qualidade sensorial e nutricional dos vegetais minimamente processados, e na potencial presença de componentes tóxicos. Revelaram mais uma vez que, o  $\text{ClO}_2$  é um forte oxidante, com um grande potencial como agente desinfectante, mesmo no âmbito dos vegetais minimamente processados. Este biocida tem uma boa actividade contra uma grande variedade de microrganismos. A membrana dos microrganismos é considerada como o alvo primário, para este biocida, e este apresenta-se menos eficaz quando os microrganismos não estão tão expostos. É bastante útil para prolongar o tempo de disponibilidade, e manter a qualidade dos vegetais minimamente processados, contudo, em alguns casos este é responsável por induzir escurecimento dos mesmos, ou formar produtos lixiviados, sobretudo quando é utilizada a sua forma gasosa na desinfecção. No entanto, este não origina produtos tóxicos resultantes da sua utilização, em quantidade suficiente para ser prejudicial (Gómez-López *et al.*, 2009).

Foi ainda estudada, a eficácia do tratamento com  $\text{ClO}_2$  gasoso, para manter as qualidades e características de cenouras minimamente processadas, e verificou-se também que este é um biocida promissor para prolongar o tempo de disponibilidade destes vegetais. Mediante as condições utilizadas no estudo, o tratamento com  $\text{ClO}_2$  gasoso não afecta o índice de respiração, nem os atributos organolépticos das cenouras, descontaminando-as e prolongando os seus tempos de comercialização, em média por um dia. Verificou-se, no entanto, o crescimento de leveduras, limitando o tempo de disponibilidade das amostras tratadas (Gómez-López *et al.*, 2007).

### 6.3- Controlo microbiológico com dióxido de cloro no peixe e carne

O  $\text{ClO}_2$  é mais uma vez aplicado no contexto microbiológico, a alimentos mais complexos como o caso da carne ou peixe. Não deixando de ser eficaz, mas mostrando novos desafios, pois visto que este biocida reage por interacção com proteínas, e que as proteínas são os principais constituintes destes alimentos, a sua tarefa não fica facilitada.

Após arrefecer os produtos como a carne, podem-se iniciar processos de contaminação. Quando esta contaminação não é controlada, removida por lavagem ou outros processamentos, esta espalha-se para novas superfícies expostas, o que pode notoriamente reduzir o tempo de permanência e qualidade da própria carne no mercado. Lavar ou usar biocidas no tratamento de carne contaminada, reduz os microrganismos presentes na mesma. A desinfecção, será então um passo determinante para manter a qualidade e reduzir os microrganismos presentes neste alimento. O método de acção dos oxidantes neste alimento, é causar um dano irreversível nos ácidos gordos das suas membranas celulares e nas proteínas celulares dos microrganismos.

Procedeu-se assim, à investigação do  $\text{ClO}_2$  no tratamento de carne, Stivarius e colaboradores (2002), estudaram o efeito deste biocida, de acordo com a sua actividade contra os microrganismos, como também a sua acção em características como coloração e odor da mesma. Verificou-se que, as alterações de odor não são muito relevantes, pois o produto evapora rapidamente das superfícies tratadas, e não deixa resíduos.

No que às alterações de cor diz respeito, revelou a promoção de uma ligeira alteração, descolorando um pouco a carne para um purpura avermelhado, que pode ser causado pela oxidação da mioglobina presente na carne, causando uma diminuição na intensidade da tonalidade vermelha da carne, mas nada de muito significativo.

De acordo com a redução de microrganismos, verificou-se que o  $\text{ClO}_2$  é eficaz para reduzir todos os microrganismos testados (Stivarius *et al.*, 2002).

A utilização de biocidas, para o tratamento de carne, bem como lavagens, pasteurização por vapor, ácidos orgânicos, fosfatos alcalinos, ou outros compostos têm vindo a ser testados e utilizados para promover e assegurar a qualidade da carne, durante a sua comercialização. Múltiplas intervenções em simultâneo fornecem barreiras aos microrganismos, evitando que estes proliferem, ou mesmo sobrevivam. Será importante, quando se utiliza múltiplas técnicas, que se utilize uma ordem correcta

da aplicação de agentes antimicrobianos. Mesmo a hidratação antes e durante o tratamento da carne com desinfectantes, promove a protecção da carne contra bactérias patogénicas.

Foi estudada a efectividade ao aplicar múltiplas técnicas de desinfecção, durante a produção da carne, na redução de microrganismos e na alteração de características deste produto alimentar. Conclui-se que, uma das mais eficazes, é a que inclui a utilização de  $\text{ClO}_2$ , reduzindo eficazmente o número de microrganismos presentes na carne, com muito pouco efeito no odor e coloração da mesma. Esta técnica pode assim ser aplicada de forma segura sem impacto negativo na alteração das características de um produto fresco, como é o caso da carne (Pohlman *et al.*, 2002).

O  $\text{ClO}_2$  pode ser aplicado também na descontaminação de peixe, tal como Medrala e colaboradores (2003), revelaram. Observou-se o efeito do biocida para remover *Listeria monocytogenes* deste alimento, sendo que, o peixe congelado representa um baixo risco de contaminação por este microrganismo, mas não pode ser excluído de servir de vector para a sua infecção. Conclui-se, que factores como o calor, e o *stress* em meio ácido, contribuem para a resistência do microrganismo. Sendo que, o  $\text{ClO}_2$  desinfecta eficazmente o peixe a uma concentração relativamente baixa, entre 0,8 a 1ppm é suficiente, a um tempo de contacto bastante rápido, aproximadamente 20 segundos de tratamento. Deve prestar-se especial atenção na limpeza e processos de desinfecção das linhas de processamento e equipamentos utilizados (Medrala *et al.*, 2003).

## **Capítulo 7- Dióxido de Cloro aplicado a superfícies**

Quando se pretende aplicar o  $\text{ClO}_2$  a diferentes superfícies, há que ter em conta diferentes variáveis. As que advêm do desinfectante, bem como as que advêm do material a desinfectar. O desinfectante terá que ser adequado, em dose, tempo de contacto, ou mesmo método de produção adequado. O material a desinfectar, poderá ser mais ou menos poroso, permeável, com estrutura mais ou menos complexa, mesmo uma forma mais irregular e de difícil acesso deve ser tida em conta, para se conseguir um bom resultado.

As áreas a que queremos aplicar o desinfectante são, após isto, a segunda barreira. Desinfetar um pequeno espaço, já em si apresenta características que facilitam a sua desinfecção, ao contrário de um espaço de maiores dimensões, que em geral, exige uma maior quantidade de desinfectante. Consoante o tamanho do espaço, terá de se aplicar uma desinfecção durante o tempo adequado, para que os resíduos, ou mesmo a quantidade de desinfectante, não se tornem tóxicos para os humanos ou outros seres vivos, que possam estar em contacto com a área a desinfectar.

Neste tipo de desinfecção, a forma mais utilizada do  $\text{ClO}_2$  é, sob a sua forma gasosa, pois consegue-se atingir maiores áreas, dado que, as moléculas gasosas difundem melhor do que a sua forma aquosa, ainda na forma gasosa, este desinfectante consegue atingir espaços de difícil acesso de forma mais facilitada, do que na sua forma aquosa. Dado que, o  $\text{ClO}_2$  consegue ser igualmente eficaz em ambas as formas, bem como existe em igual pureza em ambas, apenas será necessário escolher qual a forma que mais vantagem trará, à sua aplicação. No entanto, quando se pretende utilizar o  $\text{ClO}_2$  na forma gasosa, este deverá preferencialmente ser produzido no local, devido aos riscos inerentes ao seu armazenamento, como já referido, quando é necessário utilizar este desinfectante em concentrações mais elevadas, ou quando acontece o caso de o aplicar a áreas maiores.

### **7.1- Desinfecção de equipamentos com dióxido de cloro**

Quando se trabalha com alimentos, uma das principais fontes de contaminação são os equipamentos em contacto com estes. Portanto, será importante manter esses equipamentos de forma cuidada, tendo atenção ao desenvolvimento microbiano que neles pode ocorrer.

Todas as superfícies em contacto com alimentos podem ser possíveis fontes de contaminação, podendo ocorrer formação de biofilmes, ou desenvolvimento de microrganismos com capacidade de crescer em diferentes superfícies. Um destes microrganismos é por exemplo *Listeria monocytogenes*. Os alimentos considerados de alto risco de infecção por este microrganismo são, os produtos chamados de “pronto a comer”, especialmente aqueles que necessitam de refrigeração, por um longo período. As opções para colmatar este problema serão, adicionar antimicrobianos, ou utilizar processos para inibir, reduzir ou eliminar o crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Trinetta e colaboradores (2012), estudaram o tratamento com  $\text{ClO}_2$  gasoso, nas superfícies de equipamentos em contacto com alimentos, no sentido de perceber se este biocida inactiva eficazmente *Listeria monocytogenes*. Este estudo, valida a eficácia do biocida para desinfectar superfícies, nos equipamentos testados. No estudo verificou-se, que o biocida inicialmente tem uma boa efectividade em biofilmes, mas a população que ainda resta permanece menos sensível a este, mesmo aumentando a concentração do gás utilizado. Isto explica, o porquê de para inactivar biofilmes, ser necessário um maior tempo de contacto do biofilme com o biocida, verificando-se, uma diferença de 70 minutos para inactivar biofilmes, e de apenas 30 minutos para inactivar microrganismos singulares. Validou-se então, de acordo com este estudo, este biocida como eficaz para desinfectar as superfícies dos equipamentos, inactivando completamente *Listeria monocytogenes*, com este tratamento a uma concentração de 2mg/L, por um tempo de contacto de 30 minutos (Trinetta *et al.*, 2012).

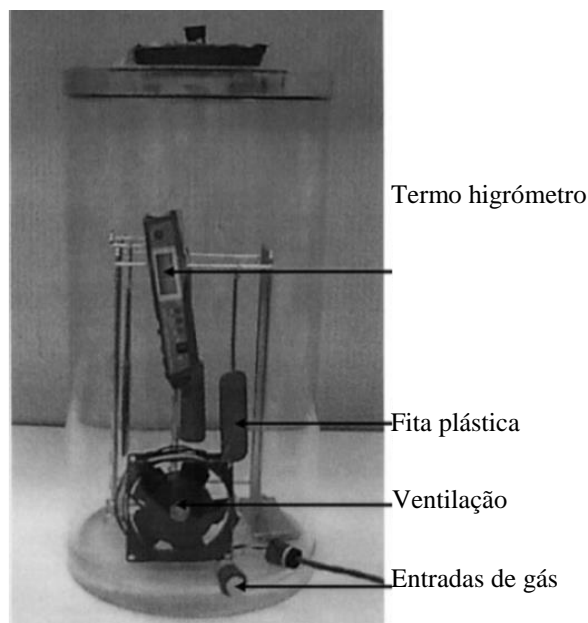
O  $\text{ClO}_2$  pode ser utilizado para desinfectar as superfícies em contacto com alimentos, sob a forma de gás, ou em solução aquosa. Este biocida, demonstrou apresentar um efeito sete vezes superior ao cloro, em concentrações iguais, quando aplicado na água fria, para o processamento de carne de aves. O  $\text{ClO}_2$  gasoso, também demonstrou elevada actividade esporicida, contra os esporos de *Bacillus spp.* e de *Clostridium spp.*, quando tamponado com fosfato de potássio a pH entre 4,5 e 8,0. A actividade bactericida do  $\text{ClO}_2$  aquoso, não é afectada pelo pH elevado, ou presença de amónia, ou componentes nitrogenados, e é menos reactivo com compostos orgânicos, quando comparado ao cloro.

O sumo de laranja, é derivado de um fruto, igualmente susceptível a crescimento microbiano, está incluído neste contexto pois é necessário o mesmo controle e cuidados



que qualquer outro alimento. Os microrganismos que podem desenvolver-se no sumo de laranja, e são responsáveis pela sua decomposição, são microrganismos ácido-tolerantes, logicamente, sobreviverão no pH ácido que este possui, como leveduras e bolores, sendo as mais reportadas a maiores danos leveduras fermentativas, *Saccharomyces* e *Candida*, entre outras.

Sendo assim, será importante desinfetar as superfícies com que o sumo contacta, para impedir o desenvolvimento dos microrganismos capazes de o degradar, e provocar afecções nos seus consumidores. Foi estudada a eficácia do  $\text{ClO}_2$  gasoso para desinfetar os tanques de armazenagem do sumo de laranja (figura 5), determinando, que este, na sua forma gasosa, pode com eficácia inactivar uma grande variedade de microrganismos, tais como *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida spp.*, *Eurotium spp.*, e *Penicillium spp.*, nesta superfície. Portanto, adequa-se este biocida para a desinfecção pretendida. Neste estudo, os parâmetros utilizados para obter estes resultados foram, uma concentração de entre 8 a 10 mg/L de  $\text{ClO}_2$  gasoso, com um tempo de exposição médio, entre os 10 a 30 minutos, a uma humidade relativa de 85 a 95%, e a temperaturas entre os 9 a 28°C (Han *et al.*, 1999).



**Figura 5.** Imagem esquemática do modelo de tanque utilizado para a desinfecção, no estudo mencionado. (Adaptado de: Han, Guentert, Smith, Linton, & Nelson, 1999)

## 7.2- Desinfecção de salas e grandes superfícies com dióxido de cloro

Os grandes espaços com superfícies a desinfectar são os mais exigentes, do ponto de vista de eficácia, e mesmo de conteúdo ou forma do desinfectante a utilizar. Estes espaços, são afectados por diversos microrganismos, sendo dos mais difíceis de controlar e mais comuns, os esporos. Os esporos, são das principais formas de resistência a ter em conta, são das mais difíceis de controlar, porque conseguem resistir a grandes variações de pressão e temperatura, por este facto, são as formas mais difíceis de remover das superfícies.

Os esporos de bacilos, estão inclusive, entre as formas de vida mais resistentes à inactivação, com exemplos de esporos que se conseguiram reviver do âmbar com 25 a 40 milhões de anos, ou que se isolaram de inclusões saturadas salinas datadas de 250 milhões de anos.

Os esporos de *Bacillus anthracis*, por exemplo, são consideradas como armas biológicas bastante eficazes, e a tempos cronológicos diferentes tem sido introduzidos como parte do arsenal de diferentes nações, para guerras biológicas/químicas. A resistência destes esporos, pode fazer a descontaminação de superfícies bastante dificultada, tornando imperativo a existência de desinfectantes químicos capazes de controlar estas formas de resistência. Existem muitos relatos de produtos capazes de inactivar os esporos de *Bacillus anthracis*, mas no entanto, os estudos feitos a esses biocidas foram realizados noutras espécies de bacilos, diferente da espécie *Bacillus anthracis*. Existem diferenças estruturais, e moleculares, entre os esporos das espécies de bacilos. O *Bacillus anthracis*, é revestido de um exoesporo, ao contrário das outras espécies de bacilos. Estas diferenças, de camada externa, composição, ausência ou presença de exoesporo, podem resultar em diferentes formas de sensibilidade dos bacilos, à sua inactivação pelos biocidas.

Deve ter-se em conta, também, a diferença na inactivação dos esporos de acordo com o facto de estes se encontrarem em suspensão, ou se encontrarem apenas depositados num local contaminado, e sem qualquer líquido circundante. Pois, a maioria dos microrganismos, apresentam muito maior resistência à desinfecção, quando depositados numa superfície contaminada, do que quando estão suspensos num meio líquido.

Sagripanti e colaboradores (2007), estudaram então a sensibilidade de diferentes esporos das espécies de bacilos, com diferentes desinfectantes, para verificar se existe de facto diferenças, de acordo com as suas variabilidades morfológicas, e estruturais, na inactivação dos mesmos. Resultando que, todos os esporos de bacilos apresentam sensibilidade semelhante aos biocidas, bem como, semelhante sensibilidade à inactivação por luz ultra violeta, todos os esporos estavam sujeitos às mesmas condições. Os resultados deste estudo, levam a concluir que, pode-se extrapolar a inactivação de espécies não patogénicas de bacilos, para espécies patogénicas como o *Bacillus anthracis*, e assim tornar estes testes por um lado menos dispendiosos, por outro, mais seguros (Sagripanti *et al.*, 2007).

Os esporos não só contaminam várias superfícies, como ainda podem mesmo ser usados por humanos para fins nada ortodoxos, fazendo-se uso destes para ataques biológicos, como referido anteriormente, criando guerras químicas, e afectando nações com a sua utilização. Exemplo disso, são os ataques por carta, utilizando esporos de *Bacillus anthracis*, no final de 2001, resultando em contaminações de vários edifícios nos Estados Unidos. As contaminações ocorreram de forma directa por contacto com as cartas contaminadas, ou indirecta por contaminação cruzada. Os envelopes foram enviados para o serviço nacional de correio dos Estados Unidos, para diversas localidades como a Florida, Nova Jersey, Nova York, Washington, ocorrendo vinte e dois casos de infecções por anthrax, e acabando mesmo por resultar daí cinco mortes. Os edifícios foram posteriormente sujeitos a fumigação com biocidas, entre estes biocidas o  $\text{ClO}_2$ , a uma concentração de 9000ppm por hora. Foi então lançado, o primeiro relato, de tentativa de utilização de  $\text{ClO}_2$  para descontaminar um espaço tão grande. Resultando numa desinfecção eficaz, após estudos realizados a amostras das superfícies contaminadas.

Quando o  $\text{ClO}_2$  necessita ser produzido em tão grande quantidade, é preferível gera-lo no local, com equipamentos que consigam produzir tais quantidades, como já referido anteriormente, pode ver-se exemplo de um destes geradores na figura 6. De acordo com Rastogi e colaboradores (2010), realizaram-se duas técnicas, para o controlo dos casos de 2001, um processo seco e outro húmido. No processo seco, o gás de cloro passou através de uma câmara contendo hipoclorito de sódio, e formou o  $\text{ClO}_2$  gasoso. No processo húmido, o ácido hipocloroso reagiu com hipoclorito de sódio e gerou cloro, que imediatamente reagiu também com o hipoclorito de sódio, e gerou

ClO<sub>2</sub>. O método húmido, no entanto, revelou-se o mais utilizado para os processos de desinfecção de grandes espaços por fumigação de ClO<sub>2</sub> (Rastogi *et al.*, 2010; Wood & Blair Martin, 2009).



**Figura 6.** Fotografia tirada do gerador de ClO<sub>2</sub> gasoso para descontaminar grandes espaços. (Adaptado de: Wood & Blair Martin, 2009)

Foi analisada então a eficácia dos dois métodos de produção do ClO<sub>2</sub> em diferentes materiais, tais como madeira, carpete, telhas, gesso pintado, blocos de cimento sem pintura, e ainda a eficácia deste gás como biocida para esporos de *Bacillus anthracis*. Concluindo, então que, de acordo com as técnicas utilizadas para a produção de ClO<sub>2</sub>, nenhuma delas se mostrou mais vantajosa que a outra para a redução de microrganismos, portanto, ambas as técnicas de produção serão viáveis, não sendo nenhuma delas mais vantajosa do ponto de vista de actividade biocida.

Quanto aos materiais utilizados, uns apresentavam mais porosidade que outros, ou eram mais complexos, e por isso doses diferentes de ClO<sub>2</sub> foram necessárias para inactivações semelhantes. O tempo de exposição mais longo, com maior dose aplicada, foi na madeira de pinho. Foram, portanto, os materiais mais exigentes para descontaminação com ClO<sub>2</sub>, a madeira e as telhas, necessitando de maior quantidade de ClO<sub>2</sub> por mais tempo. A superfície da madeira apresenta, talvez, uma menor concentração local de ClO<sub>2</sub>, pois quando se faz a fumigação com ClO<sub>2</sub>, possivelmente, ocorre a interacção com componentes da madeira, tal como a celulose ou lenhina, passando a existir menos ClO<sub>2</sub> disponível, para a inactivação dos esporos. Sem falar na porosidade da madeira ser superior, portanto, ocorrerá sempre uma maior variabilidade

quando se pretende inactivar esporos nesta superfície. Quanto aos outros materiais a descontaminar, estes revelaram não mostrar qualquer dependência das concentrações utilizadas na fumigação. Uma concentração de 3000ppm pareceu eficaz para todos os materiais estudados.

Quanto aos esporos de *Bacillus anthracis* em estudo, as concentrações necessárias de  $\text{ClO}_2$  para os inactivar em materiais como vidro e aço, foram muito inferiores às utilizadas nos materiais de construção. No aço e vidro conseguiram-se bons resultados, num tempo de exposição muito inferior a qualquer outro material testado, embora tenham sido submetidos a igual contaminação (Rastogi *et al.*, 2010).

Estudou-se a aplicação da fumigação de  $\text{ClO}_2$  em *Bacillus thuringiensis*, espécie semelhante a *Bacillus anthracis*, pertencendo ao mesmo subgrupo, e apresentando semelhante morfologia, ambos Gram positivos, formadores de esporos também estes com semelhante composição, mas no entanto, não é patogénico. Analisou-se a aplicabilidade da fumigação com  $\text{ClO}_2$ , para desinfectar materiais como o papel, a madeira, e o plástico. Revelando que, a inactivação destes esporos nos materiais estudados seria tanto superior, quanto maior a concentração da fumigação com o biocida. O material mais difícil de desinfectar, requerendo períodos de tempo mais longos de desinfeção, nas condições estudadas, foi o papel, ao contrário das superfícies plásticas, que apresentaram uma maior facilidade. Não se revelaram diferenças acentuadas entre as superfícies de madeira e as superfícies plásticas. As concentrações mínimas para inactivar completamente os esporos no papel ou madeira, foram de 30mg/L, sendo que, para as superfícies plásticas apenas foi necessário 25mg/L ou 20mg/L (Han & Applegate, 2003).

## Capítulo 8- Mecanismos de inactivação dos microrganismos pelo Dióxido de Cloro

Sobre o mecanismo de acção deste biocida, muito já foi especulado. No entanto, foram poucas as conclusões a que se chegou até agora. Não existe certeza para um mecanismo fixo, deste composto. Sabe-se que, ele actua inespecificamente, em vários componentes celulares dos microrganismos, levando à sua inviabilidade. Mas ainda, não se conseguiu dizer se este actua apenas de um único modo, ou se actua em diversos locais gerando o resultado final que é a inviabilidade dos microrganismos (Ogata, 2007).

Sabe-se que, este não reage com os organitos das células, nem actua directamente nas membranas, inviabilizando as mesmas. Pensa-se, assim, que o seu mecanismo de acção passe sobretudo, pela sua acção sobre os aminoácidos que constituem quase todos os tecidos vivos, como a tirosina, a cisteína, o triptofano ou a 5'-guanosinamonofofato (Stewart *et al.*, 2008).

As proteínas são oxidadas por muitas espécies reactivas, tais como aniões superóxido, radicais hidroxilo, ou mesmo pela molécula de oxigénio, de ozono, pelo peróxido de hidrogénio ou pelo ácido hipocloroso. Neste caso, há que ocorrer verificação se o  $\text{ClO}_2$  também irá reagir com as proteínas, dado que, também este é um forte oxidante, e de que forma esta reacção ocorre, para poder confirmar esta hipótese, e concluir mais sobre esta questão de difícil resposta.

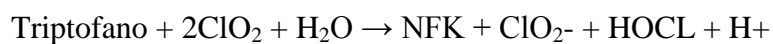
Nas evidências encontradas por Xue e colaboradores (2013), que se debruçaram a estudar este tema em vírus, como Rotavírus humano, conclui-se que, não existe qualquer relação entre os danos apresentados no genoma vírico, e o mecanismo de acção deste biocida na perda de viabilidade do vírus (Xue *et al.*, 2013).

Também Miura & Shibata (2010), se referem a esta temática no vírus Influenza. Estes, inicialmente pensaram que, o seu efeito antiviral se devia à desnaturação de proteínas da superfície vírica, tais como a hemaglutinina e a neurominidase. Dado que, quando o  $\text{ClO}_2$  aumenta a sua actividade, tanto a hemaglutinina como a neurominidase diminuem a sua. Para verificar tais factos, analisaram as interacções do  $\text{ClO}_2$  com proteínas, utilizando a albumina bovina e a glucose-6-fosfodesidrogenase, como proteínas modelo. Procederam então à análise de ressonância magnética nuclear,

cromatografia líquida de alta performance, e espectrofotómetro de massa, revelando que, o  $\text{ClO}_2$  promoveu uma modificação oxidativa nos resíduos de tirosina, para 3,4.dihidroxifenilalanina (DOPA), e 2,4,5.trihidroxifenilalanina (TOPA), e o resíduo triptofano para N-formilquinureina. Conseguiram concluir, então que, as alterações nos péptidos derivados da hemaglutinina e neuraminidase, eram causadas pela oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano. Foi então sugerido que, o mecanismo de inactivação dos vírus pelo  $\text{ClO}_2$ , se deve à modificação oxidativa destes dois resíduos de aminoácidos. Ambos os resíduos (tirosina e triptofano), estão contidos nas proteínas hemaglutinina e neuraminidase, do vírus Influenza, sugerindo assim, o seu potencial efeito antivírico, mesmo a baixa concentração de biocida (Miura & Shibata, 2010).

Com base no efectuado por, Wei e colaboradores (2008), mostrou-se que o  $\text{ClO}_2$  actua em fungos como a *Candida albicans*, sobretudo por permeabilização das suas membranas. Fazendo, com que esta sofra também perdas de potássio, pois actua nos resíduos de aminoácidos dos canais iónicos, e provoca a sua falha no controlo iónico. Ainda, por ser um oxidante não específico, actuará em componentes intracelulares não específicos, resultando num resultado inconclusivo sobre o seu efeito (consultar figura 2). Contudo, a sua perda iónica e despolarização são passos críticos, para a inviabilidade dos microrganismos (Wei *et al.*, 2008).

Tem-se estudado a interacção em singular do  $\text{ClO}_2$  com as proteínas para verificar tais fenómenos e interacções, que justifiquem o princípio da sua acção. Stewart e colaboradores (2008), investigaram nesta área a forma como o  $\text{ClO}_2$  oxida o triptofano, de acordo com a sua cinética, mecanismo, e produtos formados. Revelando que, esta reacção se dá a uma proporção estequiométrica de dois para um, respectivamente do  $\text{ClO}_2$  para o triptofano, formando-se produtos como o ião clorito, ácido hipocloroso e hidrogénio, bem como N'-formil-quinurenina, segundo a reacção:



Este estudo, mostra que, a oxidação do triptofano pelo  $\text{ClO}_2$  se dá de forma relativamente rápida, a pH 7, numa reacção de segunda ordem, a uma velocidade constante de  $3,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . A oxidação do triptofano, forma diversos produtos intermédios, e no final N'-formil-quinurenina, entre outros. A pH 7, a velocidade da reacção do  $\text{ClO}_2$  com o triptofano é mais lenta, do que a reacção deste com a tirosina

$1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , ou com a cisteína  $6,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , no entanto, é bem mais rápida que a reacção deste com a guanosina 5'-monofosfato  $4,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Stewart *et al.*, 2008).

Quando o  $\text{ClO}_2$  reage com o triptofano, ocorre evidência instantânea da alteração de cor da solução, de amarelo, como é seu característico, para castanho. O  $\text{ClO}_2$  preferencialmente ataca de forma competitiva o nitrogénio presente no aminoácido triptofano, formando hidroxilaminas, oxiaminas e iminas. Neste processo, o  $\text{ClO}_2$  pode ser convertido a cloro, enquanto, se formará um radical catiónico do triptofano. Os primeiros produtos obtidos da reacção do  $\text{ClO}_2$  com o triptofano são instáveis, então as reacções continuam, maioritariamente por hidroxilação, carboxilações, descarboxilação e abertura de anéis aromáticos. Resultando os seus produtos finais já indicados.

A cisteína, é de todos os aminoácidos o que reage de forma mais rápida com o  $\text{ClO}_2$ , devido ao seu conteúdo em grupos sulfúricos. Ocorrendo assim, a sua acção sobre as bactérias, compostas sobretudo por este aminoácido, quando o  $\text{ClO}_2$  penetra a membrana e oxida os grupos tiol (SH) a grupos compostos apenas por átomos sulfúricos (SS), promove-se a interrupção da actividade enzimática, conduzindo à morte das bactérias, pois inviabiliza o continuar da sua reprodução. Os grupos tiol também desempenham um papel importante na manutenção do potencial redox, bem como na protecção das células, sobretudo, das espécies microbianas aeróbias (Ison *et al.*, 2006).

A reacção do  $\text{ClO}_2$  com a tirosina, passa pelos mesmos processos que as anteriores, inicia-se também de uma estequiometria de dois para um, entre  $\text{ClO}_2$  e tirosina, respectivamente, mas no caso os produtos finais são a 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina, mais conhecida como L-DOPA. Tal como nos outros processos, numa primeira fase há a formação de uma tirosina electricamente carregada, seguida por formação de radicais, carboxilações e descarboxilações da cadeia fenólica lateral (Napolitano *et al.*, 2005; Navalon *et al.*, 2009).

No entanto, a dúvida fica, sobre este biocida reagir ou não com os ácidos nucleicos, para inviabilizar os microrganismos, ou se este baseia a sua acção, sobretudo, nos resíduos de aminoácidos das proteínas, como descrito até aqui neste capítulo. Utilizando como exemplo de ácido nucleico, um composto presente neste, a guanosina 5'-monofosfato, e fazendo-se reagir o biocida directamente com esta molécula, trabalho realizado por, Napolitano e colaboradores (2006). Estes indicam que, o biocida reage de forma rápida a pH 7, mas apesar disso, nunca consegue ser uma reacção mais rápida do



que ocorre com outros resíduos de proteínas, como são os casos da cisteína ou tirosina, revelando, portanto que, o seu efeito biocida será talvez mais relacionado com o seu efeito sobre as proteínas do que sobre os ácidos nucleicos (Napolitano *et al.*, 2006).

Leva a crer assim, após recolher todos estes dados, e verificando os estudos, que o  $\text{ClO}_2$  actua sobretudo nos resíduos de aminoácidos das proteínas, acabando por reagir de algum modo também com os ácidos nucleicos, mas nunca de igual forma. Se todos os seres vivos são constituídos por proteínas, e se necessitam delas para a sua sobrevivência e subsistência, interromper a sua síntese e inviabilizar essas proteínas, faz com que não seja possível continuar a desenvolver as culturas microbianas. Ao reagir com a cisteína pára a produção de ATP dos microrganismos e estes morrem. A cisteína com os seus tióis biológicos desempenha um papel fundamental em todos os seres vivos, por isso é impossível para qualquer microrganismo desenvolver resistência contra o  $\text{ClO}_2$  (Noszticzius *et al.*, 2013).

## Capítulo 9- Conclusão

Esta monografia descreve as aplicações do composto dióxido de cloro como biocida, as suas características em geral, a sua segurança bem como aspectos do seu carácter. Tentou-se perceber e explicar o seu mecanismo de acção, que ainda não está completamente claro ou objectivado.

Sabe-se que, este gás possui propriedades desinfectantes bastante vantajosas. Aquando da sua utilização é eficaz contra a maioria dos microrganismos testados, havendo excepções. Possui cloro na sua composição mas é mais eficaz e menos nocivo do que o cloro singular. Produz menos produtos nocivos e apresenta uma capacidade de resistência às condições ambientais muito superior, quando comparado com o anterior. É um biocida de excelência, revelando poucas desvantagens do seu uso, bem como é seguro na aplicação a humanos.

Na sua produção, pode recorrer-se a diversas técnicas e deve ter-se em conta onde, e para que, aplicação se destina. O seu armazenamento, deve ser cuidado e nem sempre é possível realizar-se, elevadas concentrações tornam este processo arriscado. Deve produzir-se apenas quantidades suficientes para aplicação, e pequenas quantidades armazenadas, ou então, realizar a sua aplicação imediatamente seguida da produção, podendo desta forma desinfectar grandes áreas durante um longo período de tempo.

Quase todos os microrganismos, mais ou menos complexos, são susceptíveis a este biocida. Apresentando a enorme vantagem de que dificilmente estes conseguem criar resistências a ele, dado que, este biocida actua nos resíduos de aminoácidos que são essenciais para os microrganismos. Actuando em humanos ou animais, este não apresenta sérios riscos, pois existe a circulação sanguínea que apoia todo o sistema, servindo como barreira defensiva ou corrigindo qualquer alteração que este composto possa provocar.

É um composto versátil, pois consegue ser utilizado quer sob a forma gasosa quer sob forma líquida, mantendo-se apenas dissolvido, com a sua molécula intacta, em ambas as formas de apresentação. Produzindo-se inicialmente na forma gasosa, sendo que, se necessário basta dissolvê-lo em água, pois é bastante solúvel, sobretudo em água fria. Assim, basta perceber o tipo de desinfecção que se pretende e tipo de material a que se pretende aplicar, e escolher a forma de aplicação que melhor se aplica. Pois, a

sua eficácia em ambas as formas é comparável, nunca apresentado diferenças muito significativas.

Já se verificou, que consegue ser eficaz na destruição de biofilmes, um dos desafios mais complicados para qualquer desinfectante. Não sendo apenas eficaz contra esta estrutura complexa, como ainda, pode impedir novo reaparecimento das mesmas, é ainda também eficaz contra estruturas de resistência máxima, como os esporos. Torna-se uma mais-valia para a indústria alimentar, para o tratamento de águas ou mesmo para a desinfecção de superfícies. Mostrando-se um biocida sem muitas falhas, pois dado que é tão versátil em termos de quantidades de produção e forma, que quase sempre se consegue aplicar e conseguir resultados bastante positivos. Por vezes, é eficaz a tão baixas concentrações que acaba por se tornar bastante económica a sua utilização.

Este consegue controlar diversos parâmetros da água, não sendo só a proliferação bacteriana, mas também o odor, a coloração e pureza. É cada vez mais utilizado, pois os compostos anteriormente usados originavam produtos com elevado risco cancerígeno, e com a aplicação deste tais produtos são reduzidos a quantidades mínimas, não se tornando alarmantes, não contaminando solos, nem culturas, nem afectando humanos no consumo, ou utilização de água, desinfectada com este biocida.

É aplicado a superfícies, desde áreas mínimas, como canais dentários, bem como a áreas maiores, chegando mesmo a ser aplicado a edifícios, e a utilizar-se no combate a guerras biológicas. É aplicado para desinfectar o ar e diminuir microrganismos que infectam através deste veículo, como no caso da gripe. Consegue actuar como barreira, impedindo que os microrganismos se desenvolvam e infectem humanos ou animais, ou pode ser aplicado como correctivo após altas infecções e contaminações, no combate e controlo de áreas contaminadas tornando o ambiente seguro para qualquer ser vivo.

O seu mecanismo de acção ainda não é completamente claro, pois não se conseguindo definir do início ao fim como este biocida afecta os microrganismos, sabe-se que tem elevada afinidade para grupos sulfúricos, apresentando grande afinidade, como tal, para o aminoácido cisteína que possui um núcleo rico em grupos sulfúricos. Apresenta ainda afinidade elevada para outros aminoácidos, como sendo o triptofano e a tirosina. Consegue também, apresentar afinidade para algum conteúdo dos ácidos nucleicos mas não de forma tão forte. Crê-se que este actue sobretudo nos resíduos proteicos, não promovendo alterações significativas no genoma dos seus alvos.

Concluindo, este composto tem um amplo espectro de acção, apresenta diversas vantagens relativamente a outros, é versátil, possui duas formas de aplicação, pode ser produzido de formas relativamente fáceis e é eficaz a baixas concentrações, acabando por se tornar mais económico. Ainda falta perceber um pouco melhor o seu mecanismo de acção, pelo que se deve fazer mais esforços para conseguir delinear a forma como este interage, de facto, com os microrganismos, não apenas estudos de interacção deste isoladamente com as estruturas que se pretende.

## Bibliografía

- Aday, M. S., & Caner, C. (2014). Individual and combined effects of ultrasound, ozone and chlorine dioxide on strawberry storage life. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 344–351. doi:10.1016/j.lwt.2014.01.006
- Ayyildiz, O., Ileri, B., & Sanik, S. (2009). Impacts of water organic load on chlorine dioxide disinfection efficacy. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2-3), 1092–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.02.153
- Chen, Q., Wang, Y., Chen, F., Zhang, Y., & Liao, X. (2014). Chlorine dioxide treatment for the removal of pesticide residues on fresh lettuce and in aqueous solution. *Food Control*, 40, 106–112. doi:10.1016/j.foodcont.2013.11.035
- Chomkitichai, W., Chumyam, A., Rachtanapun, P., Uthaibutra, J., & Saengnil, K. (2014). Reduction of reactive oxygen species production and membrane damage during storage of “Daw” longan fruit by chlorine dioxide. *Scientia Horticulturae*, 170, 143–149. doi:10.1016/j.scienta.2014.02.036
- Chung, C., Huang, T., & Yu, C. (2011). Bactericidal effects of fresh-cut vegetables and fruits after subsequent washing with chlorine dioxide. ... *of Chemical, Biological ...*, 9, 107–112. Retrieved from <http://www.ipcbee.com/vol9/21-B049.pdf>
- Czarneski, M. (2007). Selecting the right chemical agent for decontamination of rooms and chambers. *APPLIED BIOSAFETY*, 12(2), 85–92. Retrieved from <http://mail.absa.org/abj/abj/ABJ2007v12n2.pdf#page=19>
- Czarneski, M. A., & Lorcheim, P. (2005). Isolator Decintamination Using Chlorine Dioxide Gas. *Pharmaceutical Technology*, (April), 124–133.
- EPA Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants. (1999). Retrieved July 30, 2014, from [http://www.epa.gov/ogwdw/mdbp/pdf/alter/chapt\\_4.pdf](http://www.epa.gov/ogwdw/mdbp/pdf/alter/chapt_4.pdf)
- Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Ragaert, P., & Debevere, J. (2007). Shelf-life extension of minimally processed carrots by gaseous chlorine dioxide.

- International Journal of Food Microbiology*, 116(2), 221–7.  
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.008
- Gómez-López, V. M., Ragaert, P., Jeyachandran, V., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2008). Shelf-life of minimally processed lettuce and cabbage treated with gaseous chlorine dioxide and cysteine. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 74–83. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.036
- Gómez-López, V. M., Rajkovic, A., Ragaert, P., Smigic, N., & Devlieghere, F. (2009). Chlorine dioxide for minimally processed produce preservation: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(1), 17–26. doi:10.1016/j.tifs.2008.09.005
- Han, Y., & Applegate, B. (2003). Decontamination of *Bacillus thuringiensis* spores on selected surfaces by chlorine dioxide gas. *Journal of Environmental ...*, 66(4), 16–20. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/14621648>
- Han, Y., Guentert, A., Smith, R., Linton, R., & Nelson, P. (1999). Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer for tanks used for aseptic juice storage. *Food Microbiology*, 53–61. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002098902118>
- Herczegh, A., Ghidan, A., Friedreich, D., Gyurkovics, M., Bendő, Z., & Lohinai, Z. (2013). Effectiveness of a high purity chlorine dioxide solution in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 60(1), 63–75. doi:10.1556/AMicr.60.2013.1.7
- Hornstra, L., Smeets, P., & Medema, G. (2011). Inactivation of bacteriophage MS2 upon exposure to very low concentrations of chlorine dioxide. *Water Research*, 45(4), 1847–55. doi:10.1016/j.watres.2010.11.041
- Ison, A., Odeh, I., & Margerum, D. (2006). Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide and chlorite oxidations of cysteine and glutathione. *Inorganic Chemistry*, 45(21), 24–26. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic0609554>

- Jin, R., Hu, S., Zhang, Y., & Bo, T. (2009). Concentration-dependence of the explosion characteristics of chlorine dioxide gas. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3), 842–847. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.11.124
- Jin, R. Y., Hu, S. Q., Zhang, Y. H., & Bo, T. (2008). Research on the explosion characteristics of chlorine dioxide gas. *Chinese Chemical Letters*, 19(11), 1375–1378. doi:10.1016/j.cclet.2008.09.001
- Jin-Hua, D., & Mao-Run, F. (2007). Effects of Chlorine Dioxide Gas on Postharvest Physiology and Storage Quality of Green Bell Pepper ( *Capsicum frutescens* L. var. Longrum). *Agricultural Sciences in ....* Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1671292707600376>
- Kim, H., Kang, Y., Beuchat, L. R., & Ryu, J.-H. (2008). Production and stability of chlorine dioxide in organic acid solutions as affected by pH, type of acid, and concentration of sodium chlorite, and its effectiveness in inactivating *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology*, 25(8), 964–969. doi:10.1016/j.fm.2008.05.008
- Kim, J.-M., & Linton, R. H. (2008). Identification of a non-pathogenic surrogate organism for chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) gas treatment. *Food Microbiology*, 25(4), 597–606. doi:10.1016/j.fm.2008.02.002
- Korn, C., Andrew, R. C., & Escobar, M. D. (2002). Development of chlorine dioxide-related by-product models for drinking water treatment. *Water Research*, 36(1), 330–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11766811>
- Latif, Y., Sherazi, S. T. H., & Bhanger, M. I. (2011). Assessment of pesticide residues in commonly used vegetables in Hyderabad, Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(8), 2299–303. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.030
- Lee, S.-Y., Dancer, G. I., Chang, S.-S., Rhee, M.-S., & Kang, D.-H. (2006). Efficacy of chlorine dioxide gas against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores on apple surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 364–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.023

- Lee, S.-Y., Gray, P. M., Dougherty, R. H., & Kang, D.-H. (2004). The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. *International Journal of Food Microbiology*, 92(2), 121–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.09.003
- Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L., & Chao, F. H. (2004). Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. *Water Research*, 38(6), 1514–9. doi:10.1016/j.watres.2003.12.021
- Li, S., Zhao, D., Hu, S., Wang, Z., Li, D., Yuan, X., & Xie, B. (2013). Trichloromethane Formation Potential in Killing Algae with Chlorine Dioxide. *Procedia Environmental Sciences*, 18, 597–601. doi:10.1016/j.proenv.2013.04.081
- López-Velasco, G., Tomás-Callejas, A., Sbodio, A., Artés-Hernández, F., & Suslow, T. V. (2012). Chlorine dioxide dose, water quality and temperature affect the oxidative status of tomato processing water and its ability to inactivate *Salmonella*. *Food Control*, 26(1), 28–35. doi:10.1016/j.foodcont.2011.12.016
- Mahmoud, B. S. M., Bhagat, a R., & Linton, R. H. (2007). Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* on strawberries by chlorine dioxide gas. *Food Microbiology*, 24(7-8), 736–44. doi:10.1016/j.fm.2007.03.006
- Mahmoud, B. S. M., & Linton, R. H. (2008). Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on lettuce by chlorine dioxide gas. *Food Microbiology*, 25(2), 244–52. doi:10.1016/j.fm.2007.10.015
- Medrala, D., Dabrowski, W., Czekajło-Kołodziej, U., Daczowska-Kozon, E., Koronkiewicz, A., Augustynowicz, E., & Manzano, M. (2003). The possible effect of a sanitization program on intraspecies differentiation of *Listeria monocytogenes* strains isolated from a fish processing plant. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206(6), 583–90. doi:10.1078/1438-4639-00243
- Miura, T., & Shibata, T. (2010). Antiviral effect of chlorine dioxide against influenza virus and its application for infection control. *Open Antimicrob Agents J*, 71–78. Retrieved from



- <http://benthamsciencepublisher.com/open/toantimj/articles/V002/SI0008TOANTI MJ/71TOANTIMJ.pdf>
- Napolitano, M. J., Green, B. J., Nicoson, J. S., & Margerum, D. W. (2005). Chlorine Dioxide Oxidations of Tyrosine , N -Acetyltyrosine , and Dopa. *American Chemical Society*, 18, 501–508.
- Napolitano, M. J., Stewart, D. J., & Margerum, D. W. (2006). Chlorine Dioxide Oxidation of Guanosine 5 ' -Monophosphate. *American Chemical Society*, 19(11), 1451–1458.
- Navalon, S., Alvaro, M., & Garcia, H. (2009). Chlorine dioxide reaction with selected amino acids in water. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 1089–97. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.010
- Noszticzus, Z., Wittmann, M., Kály-Kullai, K., Beregvári, Z., Kiss, I., Rosivall, L., & Szegedi, J. (2013). Chlorine dioxide is a size-selective antimicrobial agent. *PloS One*, 8(11), 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0079157
- Ogata, N. (2007). Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry*, 46, 4898–4911. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi061827u>
- Ogata, N., & Shibata, T. (2008). Protective effect of low-concentration chlorine dioxide gas against influenza A virus infection. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 1), 60–7. doi:10.1099/vir.0.83393-0
- Pao, S., Kelsey, D. F., Khalid, M. F., & Ettinger, M. R. (2007). Using Aqueous Chlorine Dioxide To Prevent Contamination of Tomatoes with *Salmonella enterica* and *Erwinia carotovora* during Fruit Washing †, 70(3), 629–634.
- Pohlman, F. ., Stivarius, M. ., McElyea, K. ., Johnson, Z. ., & Johnson, M. . (2002). The effects of ozone, chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride and trisodium phosphate as multiple antimicrobial interventions on microbiological, instrumental color, and sensory color and odor characteristics of ground beef. *Meat Science*, 61(3), 307–313. doi:10.1016/S0309-1740(01)00198-X

- Rastogi, V. K., Ryan, S. P., Wallace, L., Smith, L. S., Shah, S. S., & Martin, G. B. (2010). Systematic evaluation of the efficacy of chlorine dioxide in decontamination of building interior surfaces contaminated with anthrax spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10), 3343–51. doi:10.1128/AEM.02668-09
- Ruffell, K., Rennecker, J., & Mariñas, B. (2000). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide. *Water Research*, 34(3), 868–876. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135499001876>
- Saengnil, K., Chumyam, A., Faiyue, B., & Uthaibutra, J. (2014). Use of chlorine dioxide fumigation to alleviate enzymatic browning of harvested “Daw” longan pericarp during storage under ambient conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 91, 49–56. doi:10.1016/j.postharvbio.2013.12.016
- Sagripanti, J.-L., Carrera, M., Insalaco, J., Ziemski, M., Rogers, J., & Zandomeni, R. (2007). Virulent spores of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species deposited on solid surfaces have similar sensitivity to chemical decontaminants. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 11–21. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03235.x
- Sanekata, T., Fukuda, T., Miura, T., & Morino, H. (2010). hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and. *Biocontrol ...*, 15(2), 45–49. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/20616431>
- Shin, H.-S., & Jung, D.-G. (2006). Determination of chlorine dioxide in water by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1123(1), 92–7. doi:10.1016/j.chroma.2006.04.089
- Shin, Y.-J., Song, H.-Y., & Song, K. Bin. (2012). Effect of a combined treatment of rice bran protein film packaging with aqueous chlorine dioxide washing and ultraviolet-C irradiation on the postharvest quality of “Goha” strawberries. *Journal of Food Engineering*, 113(3), 374–379. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.07.001

- Sigstam, T., Rohatschek, A., Zhong, Q., Brennecke, M., & Kohn, T. (2014). On the cause of the tailing phenomenon during virus disinfection by chlorine dioxide. *Water Research*, 48, 82–9. doi:10.1016/j.watres.2013.09.023
- Smigic, N., Rajkovic, A., Nielsen, D. S., Arneborg, N., Siegmundfeldt, H., & Devlieghere, F. (2010). Survival of lactic acid and chlorine dioxide treated *Campylobacter jejuni* under suboptimal conditions of pH, temperature and modified atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S140–S146. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.026
- Sorlini, S., Gialdini, F., Biasibetti, M., & Collivignarelli, C. (2014). Influence of drinking water treatments on chlorine dioxide consumption and chlorite/chlorate formation. *Water Research*, 54(0), 44–52. doi:10.1016/j.watres.2014.01.038
- Stewart, D. J., Napolitano, M. J., Bakhmutova-Albert, E. V., & Margerum, D. W. (2008). Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide oxidation of tryptophan. *Inorganic Chemistry*, 47(5), 1639–47. doi:10.1021/ic701761p
- Stivarius, M. ., Pohlman, F. ., McElyea, K. ., & Apple, J. . (2002). Microbial, instrumental color and sensory color and odor characteristics of ground beef produced from beef trimmings treated with ozone or chlorine dioxide. *Meat Science*, 60(3), 299–305. doi:10.1016/S0309-1740(01)00139-5
- Sun, X.-B., Cui, F.-Y., Zhang, J.-S., Xu, F., & Liu, L.-J. (2007). Inactivation of Chironomid larvae with chlorine dioxide. *Journal of Hazardous Materials*, 142(1-2), 348–53. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.08.030
- Trinetta, V., Vaid, R., Xu, Q., Linton, R., & Morgan, M. (2012). Inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat food processing equipment by chlorine dioxide gas. *Food Control*, 26(2), 357–362. doi:10.1016/j.foodcont.2012.02.008
- Tsai, Y.-T., Chang, J.-H., Chang, C.-Y., Hsieh, Y.-H., & Shen, S.-Y. (2014). Efficiency and mechanisms of chlorine dioxide generation by electrocatalytical process. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(2), 404–410. doi:10.1016/j.jtice.2013.06.020

- U.S. Environmental Protection Agency, (EPA). (2000). *TOXICOLOGICAL REVIEW OF CHLORINE DIOXIDE AND CHLORITE*. Washington, DC. Retrieved from <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0496tr.pdf>
- Ufermann, P., Petersen, H., & Exner, M. (2011). Disinfection aboard cruise liners and naval units: formation of disinfection by-products using chlorine dioxide in different qualities of drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215(1), 86–90. doi:10.1016/j.ijheh.2011.07.006
- Vaid, R., Linton, R. H., & Morgan, M. T. (2010). Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. *ELSEVIER - Food Microbiology*, 27(8), 979–984. doi:10.1016/j.fm.2010.05.024
- Wang, D., Zhang, D., Chen, W., Yu, S., & Shi, X. (2010). Retention of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues after chlorine dioxide treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1), 76–80. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.022
- Wei, M.-K., Wu, Q.-P., Huang, Q., Wu, J.-L., & Zhang, J.-M. (2008). Plasma membrane damage to *Candida albicans* caused by chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>). *Letters in Applied Microbiology*, 47(2), 67–73. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02387.x
- Wilson, S. C., Wu, C., Andriychuk, L. A., Martin, J. M., Jumper, C. A., Straus, D. C., & Brasel, T. L. (2005). Effect of Chlorine Dioxide Gas on Fungi and Mycotoxins Associated with Sick Building Syndrome Effect of Chlorine Dioxide Gas on Fungi and Mycotoxins Associated with Sick Building Syndrome. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5399–5403. doi:10.1128/AEM.71.9.5399
- Wood, J. P., & Blair Martin, G. (2009). Development and field testing of a mobile chlorine dioxide generation system for the decontamination of buildings contaminated with *Bacillus anthracis*. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 1460–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.062

- Wu, V. C. H., & Kim, B. (2007). Effect of a simple chlorine dioxide method for controlling five foodborne pathogens, yeasts and molds on blueberries. *Food Microbiology*, 24(7-8), 794–800. doi:10.1016/j.fm.2007.03.010
- Wu, V. C. H., & Rioux, A. (2010). A simple instrument-free gaseous chlorine dioxide method for microbial decontamination of potatoes during storage. *Food Microbiology*, 27(1), 179–84. doi:10.1016/j.fm.2009.08.007
- Xue, B., Jin, M., Yang, D., Guo, X., Chen, Z., Shen, Z., ... Li, J. (2013). Effects of chlorine and chlorine dioxide on human rotavirus infectivity and genome stability. *Water Research*, 47(10), 3329–38. doi:10.1016/j.watres.2013.03.025
- Yang, X., Guo, W., & Lee, W. (2013). Formation of disinfection byproducts upon chlorine dioxide preoxidation followed by chlorination or chloramination of natural organic matter. *Chemosphere*, 91(11), 1477–85. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.014
- Zoni, R., Zanelli, R., Riboldi, E., Bigliardi, L., & Sansebastiano, G. (2007). Investigation on virucidal activity of chlorine dioxide. experimental data on feline calicivirus, HAV and Cocksackie B5. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 48(3), 91–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18274345>